

MSC

2.º
CICLO

FCUP
CHUSJ
2019

U.PORTO

Transferência de embriões: transferir ou
criopreservar?

Ana Patrícia Gomes Martins

FC

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO



Transferência de embriões: transferir ou criopreservar?

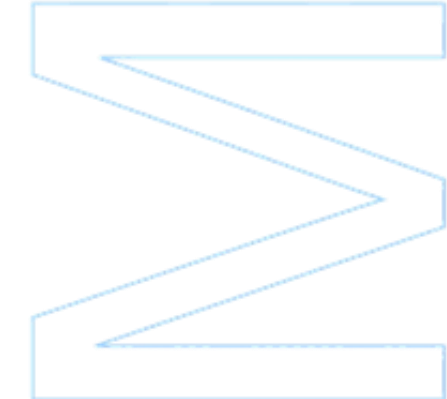
Ana Patrícia Gomes Martins

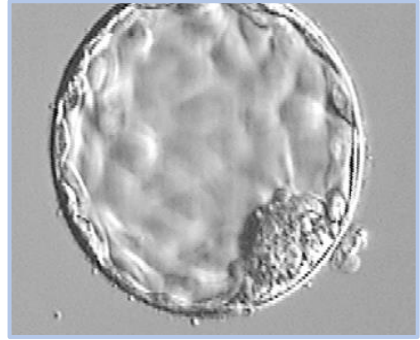
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e
Centro Hospitalar Universitário de São João

Biologia Celular e Molecular

2019

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO





Transferência de embriões: transferir ou criopreservar?

Ana Patrícia Gomes Martins

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2018/2019

Orientador

Filipa Barbosa, Embriologista Clínica, Hospital de São João

Coorientador

Vasco Almeida, Professor Auxiliar, FCUP

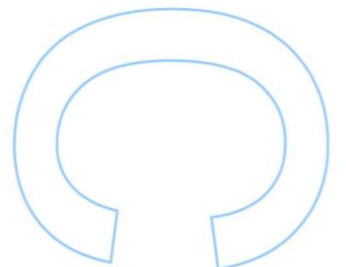
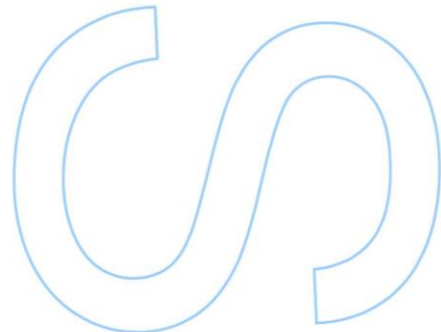
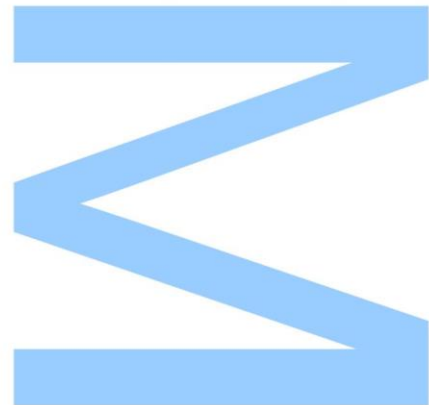
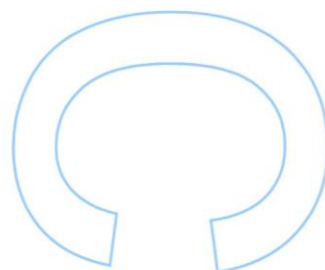
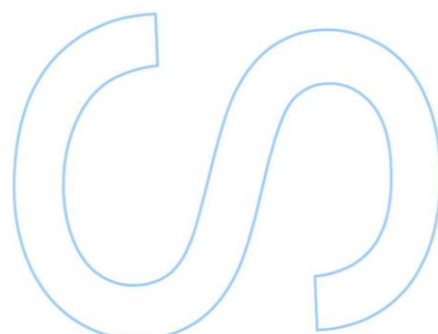
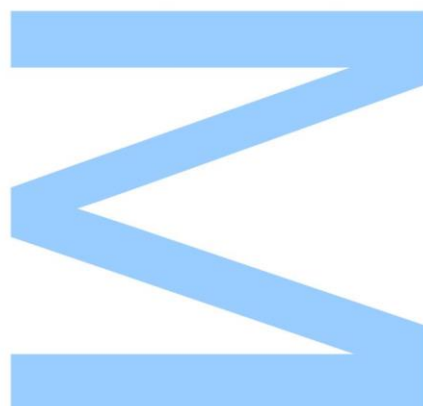


Figura da folha de rosto. Blastocisto expandido de boa qualidade, com uma massa celular interna compactada, trofoectoderme homogênea e zona pelúcida fina. Imagem cedida pelo Laboratório da Unidade de Medicina da Reprodução do Centro Hospitalar Universitário São João.



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

À Doutora Filipa Barbosa, pela oportunidade de estagiar no laboratório do Hospital de São João. Pelo esforço despendido na minha orientação e a confiança crescente que me foi entregando. Foi um prazer observar o modo e a dedicação com que trabalha, mantendo a sensibilidade e a atenção para com os colegas de trabalho e os utentes. Uma verdadeira inspiração.

Ao Professor Vasco Almeida, pelas aulas instruídas e por me cativar a investir na área da Procriação Medicamente Assistida. Pela confiança em mim depositada e pela simpatia que sempre me mostrou.

Às embriologistas Renata, Patrícia, Sofia e Neusa, pelo excelente ambiente de trabalho que proporcionaram. Por tudo o que me ensinaram, dentro e fora do laboratório, e por me incentivarem a seguir este sonho.

A toda a equipa da Unidade de Medicina de Reprodução do Hospital de São João por me receberem de braços abertos e por me mostrarem que o segredo de um bom trabalho está numa boa equipa.

Ao professor Domingos Carvalho pela imprescindível ajuda na análise estatística e interpretação dos resultados e pela motivação na reta final deste trabalho.

Aos meus pais por tudo o que investiram em mim para que pudesse encontrar o meu lugar. Obrigada por todo o carinho, pelo incentivo e pela paciência.

Ao Pedro por ser a calma e o abraço que tantas vezes preciso.

Aos meus amigos por me distraírem quando precisei e me motivarem em todos os momentos.

E ao Jorge por acreditar e estar do meu lado incondicionalmente.

Resumo

A infertilidade é considerada uma doença do sistema reprodutor caracterizada pela ausência de concepção após um ano de relações sexuais regulares e desprotegidas. Estima-se que, em todo o mundo, cerca de 50 milhões de casais serão afetados pela infertilidade. Desde o primeiro caso de sucesso da procriação medicamente assistida registou-se uma evolução brutal nas técnicas de fertilização *in vitro* e, com a integração das técnicas de criobiologia e o surgimento da vitrificação, foi possível o armazenamento de gâmetas e embriões sem compromisso da sua viabilidade. O aumento das taxas de sobrevivência embrionária após criopreservação e o sucesso da transferência de embriões criopreservados levaram à disseminação desta prática. Uma vez que a transferência embrionária é um dos momentos fulcrais de um tratamento de PMA urge esclarecer qual o momento ideal para a transferência embrionária. Esta dúvida motivou a realização de um estudo retrospectivo sobre casais que tivessem realizado transferência de embriões a fresco e criopreservados, com o objetivo de compreender qual das estratégias (transferência de embriões a fresco ou transferência de embriões criopreservados) teria rendido mais êxito e que critérios estariam associados ao sucesso da transferência. Para tal estudaram-se variáveis como a idade da mulher, o número de oócitos recuperados, a taxa de fecundação, a qualidade embrionária e a espessura endometrial e a sua interferência na taxa de gravidez bioquímica e clínica.

Os resultados permitiram definir, para os grupos delineados, que a transferência de embriões criopreservados deve ser preferida em mulheres de idade avançada (superior a 35 anos) e que, em mulheres com menos de 30 anos com uma taxa de fecundação elevada (superior a 80%) será prudente a tentativa de transferência de embriões a fresco. Quanto às restantes variáveis estudadas (número de oócitos recuperados, qualidade embrionária e espessura endometrial) não foi possível esclarecer a sua utilização como critério de seleção do momento de transferência.

Será interessante aprofundar o estudo deste tema e reunir mais informação para que, no início do ciclo, seja possível selecionar o melhor método de transferência para cada caso, personalizando o cuidado a cada paciente e, idealmente, reduzir o tempo até obtenção de gravidez e a tensão psicológica do casal.

Palavras-chave

Infertilidade, procriação medicamente assistida, criopreservação embrionária, transferência de embriões a fresco, transferência de embriões criopreservados, *freeze-all*.

Abstract

Infertility is considered a disease of the reproductive system characterized by the failure to achieve a clinical pregnancy after a year of regular and unprotected sexual intercourse. About 50 million couples around the world suffer with infertility. Since the first case of success in Assisted Reproductive Technology (ART) there has been a major revolution in in vitro techniques and, with the introduction of cryobiology techniques and the emergence of vitrification, the storage of gametes and embryos without compromising their viability became possible. The increasing embryo survival rates after thawing and the success of fresh embryo transfers led to the spreading of this technique. Since the embryo transfer is one of the crucial moments of an ART treatment it is urgent to understand what the ideal moment for transfer is.

This question motivated this retrospective study on couples who went through both fresh and frozen embryo transfers, with the aim of understanding which strategy yielded more success (fresh embryo transfer or frozen embryo transfer) and what criteria could be associated with an efficacious transfer. Therefore, we studied variables like woman's age, number of retrieved oocytes, fertilization rate, embryo quality and endometrial thickness and their interference on biochemical and clinical pregnancy.

The results allowed to establish, for the defined groups, that frozen embryo transfer should be preferred in women of advanced age (over 35 years old) and that in woman under 30 with a high fertilization rate (over 80%) it would be safe to attempt a fresh embryo transfer. As for the remaining variables (number of retrieved oocytes, embryo quality and endometrial thickness) it was not possible to elucidate on their use as criteria for selection of the moment of transfer.

It would be interesting to expand the study on this theme and gather more information so that, at the beginning of a cycle of treatment, it would be possible to select the best moment for transfer for each case, personalizing patient care and hopefully reducing the time to pregnancy and the psychological stress on the couple.

Keywords

Infertility, assisted reproduction technology, embryo cryopreservation, fresh embryo transfer, frozen embryo transfer, freeze-all.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
<i>Abstract</i>	IX
Lista de Figuras	XV
Lista de Gráficos	XVII
Lista de Tabelas	XIX
Lista de Abreviaturas	XXIII
 Introdução	 1
1. A infertilidade – conceitos gerais	3
1.1 Infertilidade conjugal – Abordagem e Avaliação	4
1.1.1 Elemento masculino	5
1.1.2 Elemento feminino	7
2. Procriação medicamente assistida	9
2.1 Inseminação intrauterina	10
2.2 Fertilização <i>in vitro</i>	11
2.2.1 FIV convencional	11
2.2.2 Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	12
2.3 Fecundação e Desenvolvimento embrionário	14
3. Transferência embrionária	17
3.1 Fisiologia da implantação embrionária	17
3.1.1 Decidualização do endométrio	17
3.1.2 Implantação embrionária e desenvolvimento primordial da placenta	19
3.2 O número de embriões e o momento da transferência	22
3.3 Aspetos a considerar durante a transferência	24
3.4 Aspetos a considerar após a transferência	31
4. Criopreservação	32
5. Transferência de embriões criopreservados	34

Objetivos	37
Material e Métodos	41
1. Critérios de elegibilidade	43
2. Análise estatística	43
3. Trabalho laboratorial	45
3.1 Protocolo de estimulação hormonal	45
3.2 Punção folicular e manipulação de gâmetas femininos	46
3.3 Manipulação de gâmetas masculinos – capacitação espermática.....	46
3.4 Fertilização <i>in vitro</i>	47
3.4.1 FIV convencional.....	47
3.4.2 Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides	47
3.5 Avaliação da fecundação e do desenvolvimento embrionário	48
3.6 Transferência embrionária	49
3.7 Criopreservação de embriões	49
4. Acompanhamento pós-transferência.....	50
Resultados	51
1. Análise descritiva da população	52
2. Sucesso dos ciclos com TEF vs ciclos com TEC	52
3. Influência das variáveis no sucesso dos ciclos.....	53
3.1 A influência da idade feminina no sucesso do ciclo	55
3.2 A influência do número de oócitos recuperados na punção no sucesso do ciclo.....	56
3.3 A influência da taxa de fecundação no sucesso do ciclo	57
3.4 A influência da qualidade embrionária no sucesso do ciclo	58
3.5 A influência da espessura do endométrio no ciclo a fresco no sucesso dos ciclos com TEF e com TEC.....	59
3.6 A influência da preparação endometrial no sucesso dos ciclos com TEC .	60

Discussão	61
1. Sucesso do ciclo após TEF e TEC	63
1.1. Idade feminina	65
1.2. Número de óocitos recuperados	66
1.3. Taxa de fecundação	67
1.4. Qualidade embrionária	68
1.5. Espessura do endométrio	70
1.6. Estimulação hormonal num ciclo com TEC	73
2. Técnica de transferência embrionária	75
3. Limitações do estudo	75
Conclusão	77
Considerações finais	81
Referências Bibliográficas	83
Anexos	101

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da inseminação intrauterina. Após o processamento da amostra seminal para capacitação espermática, os espermatozoides (SPZ) são depositados no útero, com auxílio de um cateter, ultrapassando a barreira cervical. Os espermatozoides seguem o curso natural até à trompa onde encontrarão o oócito para fecundação. [Adaptado de <http://www.drganpenang.com/frequently-asked-questions-on-intrauterine-insemination/> (consultado a 04/08/2019)]. 10

Figura 2. Fertilização *in vitro* convencional. O oócito envolvido pelas células do *cumulus* (a) é mantido em cocultura com os espermatozoides (alguns exemplares assinalados na figura pelas setas) (Imagem cedida pela UMR do CHUSJ). 12

Figura 3. Técnica de ICSI. **Esquerda:** a posição do oócito é fixada com a pipeta de sustentação (à esquerda) e o espermatozoide selecionado é aspirado e mantido na extremidade da pipeta de injeção (à direita), que se aproxima do oócito maduro (MII) – a injeção é realizada perpendicularmente à posição do GP de modo a evitar danos no fuso acromático. **Direita:** a pipeta de injeção penetra no oócito e, quando esta atinge o centro do oócito aproximadamente, a oolema rompe. Com a pipeta de injeção é realizada uma aspiração e reexpulsão do citoplasma oocitário, importante para a ativação do oócito e para garantir que o espermatozoide se envolve no citoplasma e não é removido quando a pipeta é retirada. Adaptado (Neri et al., 2018). 14

Figura 4. Zigoto com características de uma correta fecundação. Observar a localização central dos dois PN, bem como a polarização dos percursos nucleolares no interior dos PN, e a presença dos dois GP no espaço perivitelino (ASEBIR, 2015). 15

Figura 5. Desenvolvimento embrionário. **A.** Embrião em clivagem (dia 3) com início de adesão celular. **B.** Mórula com compactação celular completa (dia 4). Adaptado (ASEBIR, 2015). **C.** Blastocisto expandido (dia 5 ou dia 6) sendo visível a MCI compactada (a), a trofoectoderme (c) homogénea e com múltiplas células e o blastocélio (b) expandido (Imagem cedida pela UMR do CHUSJ). 16

Figura 6. Esquema representativo do conjunto de moléculas produzidas pelo blastocisto (Blc) e pelo endométrio, e o seu papel no sucesso da implantação. Adaptado (Singh et al., 2011a)..... 19

Figura 7. A. Esquema representativo da implantação embrionária, com um blastocisto parcialmente aderido ao endométrio uterino, aproximadamente aos 8 dias de desenvolvimento embrionário. **B.** Esquema representativo da implantação embrionária, com um blastocisto em implantação no endométrio uterino, aproximadamente aos 10 dias de desenvolvimento embrionário. Esta fase é caracterizada pela comunicação das lacunas, que se enchem de sangue. Notar a divisão do embrioblasto em epiblasto e hipoblasto, as duas camadas que constituem o disco embrionário. Adaptado (Moore et al., 2016b)..... 22

Figura 8. Representação esquemática de uma transferência embrionária sob controlo ecográfico transabdominal. Notar a colaboração da equipa envolvida, com a seleção dos embriões para transferência pelo embriologista (**A**) e a transferência embrionária propriamente dita realizada pelo médico com auxílio de outro profissional de saúde para controlo ecográfico (**B**). O médico é responsável pelo posicionamento do cateter no fundo da cavidade uterina (**C**) e pela sua deposição (**D**). Adaptado (Mariani and Bellver, 2017; Cutting, 2019). 25

Figura 9. Esquema representativo do carregamento do cateter de transferência pelo método meio de transferência – ar – meio de transferência com embrião – ar – meio de transferência, com a indicação dos volumes relativos recomendados de cada porção. Legenda: **M** – meio de transferência; **A** – ar; **E** – meio de transferência com embrião. Adaptado (Cutting, 2019)..... 27

Figura 10. Ecografia transabdominal com o cateter de transferência embrionária (**a**) inserido na cavidade uterina e de bolhas de ar (**b**) no fundo do útero. A bexiga cheia (**c**) é requisito para a realização da ecografia transabdominal. Adaptado (Singh et al., 2017). 29

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Idade média da mulher associada à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento). 55

Gráfico 2. Número médio de oócitos recuperados associado à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento). ** diferença estatisticamente marginalmente significativa ($p < 0,10$). 56

Gráfico 3. Taxa de fecundação média associada à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento). * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 57

Gráfico 4. Espessura endometrial média associada à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento). 59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de referência para os parâmetros avaliados num espermograma, definidos pela OMS (WHO, 2010).....	7
Tabela 2. Taxas de sobrevivência de embriões e blastocistos após desvitrificação obtidas com diferentes <i>kits</i> de vitrificação disponíveis atualmente no mercado.	33
Tabela 3. Caracterização da população total: valores mínimo (Mín) e máximo (Máx), média (M), desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV) das variáveis independentes.	52
Tabela 4. Teste de McNemar para comparação do sucesso do ciclo após TEF e após TEC. O Grupo 1 designa casos em que houve ocorrência de gravidez/abortamento/parto após TEF e não ocorrência destes após TEC; o Grupo 2 designa casos em que não houve ocorrência de gravidez/abortamento/parto após TEF e houve ocorrência destes após TEC. * diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). (a) foi usada a distribuição binomial. (b) estatística do teste quiquadrado com correção de continuidade.	53
Tabela 5. Definição e caracterização dos grupos A, B e C incluídos no estudo. Para as variáveis independentes são apresentados os valores médios (\bar{x}), a percentagem média ($\bar{\%}$) ou o número de casos (n) consoante a variável em causa. (1) diferença estatisticamente significativa ($p = 0,04$). (2) diferença estatisticamente significativa ($p = 0,008$).	54
Tabela 6. Teste do quiquadrado de independência e teste de LR entre a qualidade embrionária e as variáveis gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF e após TEC. Gl – graus de liberdade.....	58
Tabela 7. Teste do quiquadrado de independência entre o ciclo de estimulação e as variáveis TEC. * associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Gl – graus de liberdade.....	60

Anexo 1 - Tabela 1. Tabulação cruzada entre a ocorrência de gravidez bioquímica após TEF e gravidez bioquímica após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar. 102

Anexo 1 - Tabela 2. Tabulação cruzada entre gravidez clínica após TEF e gravidez clínica após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar. 102

Anexo 1 - Tabela 3. Tabulação cruzada entre gravidez ectópica após TEF e gravidez ectópica após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar. 102

Anexo 1 - Tabela 4. Tabulação cruzada entre parto após TEF e parto após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar. 102

Anexo 1 - Tabela 5. Tabulação cruzada entre abortamento após TEF e abortamento após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar..... 102

Anexo 2 - Tabela 1. Descrição sumária da população total relativamente à técnica de inseminação e ao fator de infertilidade associado. Caracterização da amostra: número (n) e percentagem (%) do número de casos incluídos em cada classe definida. ♀ - Feminino; ♂ - Masculino. 103

Anexo 3 - Tabela 1. Média da idade da mulher (com desvio-padrão) no momento da TEF para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco. 104

Anexo 3 - Tabela 2. Média da idade da mulher (com desvio-padrão) no momento da TEC para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados. 104

Anexo 4 - Tabela 1. Média do número de oócitos recuperados na punção (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco. ** diferença estatisticamente marginalmente significativa. 105

Anexo 4 - Tabela 2. Média do número de oócitos recuperados na punção (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados. 105

Anexo 5 - Tabela 1. Média da taxa de fecundação (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco. * diferença estatisticamente significativa. 106

Anexo 5 - Tabela 2. Média da taxa de fecundação (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados. * diferença estatisticamente significativa. 106

Anexo 6 - Tabela 1. Média da espessura endometrial (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco. 107

Anexo 6 - Tabela 2. Média da espessura endometrial (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados. 107

Anexo 7 - Tabela 1. Tabulação cruzada entre gravidez ectópica após TEC e o método de preparação endometrial (ciclo artificial ou natural). 108

Anexo 7 - Tabela 2. Tabulação cruzada entre gravidez bioquímica após TEC e o método de preparação endometrial (ciclo artificial ou natural). 108

Anexo 7 - Tabela 3. Tabulação cruzada entre gravidez clínica após TEC e o método de preparação endometrial (ciclo artificial ou natural).	108
--	-----

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
AH – Ácido hialurónico
AMh – Hormona anti-Mülleriana; *anti-Müllerian hormone*)
ASEBIR – Associação para o Estudo da Biologia da Reprodução
BC – Blastocélio
Blc – Blastocisto
CCO – *Cumulus* – *coroa radiata* – oócito
CHUSJ – Centro Hospitalar Universitário de São João
DIP – Doença Inflamatória Pélvica
DMSO – Sulfóxido de dimetilo; *dimethyl sulfoxide*
ESHRE – Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia; *European Society of Human Reproduction and Embryology*
FIV – Fertilização *in vitro*
FSH – Hormona folículo-estimulante; *follicle-stimulating hormone*
GI – Graus de liberdade
GP – Glóbulo polar
hCG – Gonadotrofina coriônica humana; *human chorionic gonadotrophin*
ICSI – Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides; *intracytoplasmatic sperm injection*
IIU – Inseminação intrauterina
LH – Hormona luteinizante; *luteinizing hormone*
LR – Razão de verosimilhança; *likelihood ratio*
MII – Meiose II
MCI – Massa celular interna
NK – *Natural Killer cell*
O₂ – Oxigénio
OMS – Organização Mundial de Saúde
PMA – Procriação Medicamente Assistida
PVP – Polivinilpirrolidona
SHO – Síndrome de hiperestimulação ovárica
SPZ – Espermatozoide
TESE – Extração testicular de espermatozoides; *testicular sperm extraction*)
TFE – Trofoectoderme
UMR – Unidade de Medicina da Reprodução

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

ZP – Zona pelúcida

Capítulo I

Introdução

1. A infertilidade – conceitos gerais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) caracteriza a infertilidade como uma doença do sistema reprodutivo definida pela ausência de gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

Um estudo feito em 2010 revelou que, em todo o mundo, aproximadamente um em cada quatro casais seja afetado pela infertilidade. Um total de aproximadamente 48,5 milhões de casais serão inférteis (Mascarenhas *et al.*, 2012).

A infertilidade feminina é responsável, em 35% dos casos, pela infertilidade do casal. Dentro destes casos, cerca de 30 a 40% têm infertilidade devida a disfunções ovulatórias e 30 a 40% devem-se a patologias tubo-peritoneais. Em 35% dos casos o fator de infertilidade é masculino. Em cerca de 15 a 30% dos casos, contudo, não é possível deslindar a causa da infertilidade do casal, sendo esta identificada como infertilidade idiopática (Quaas and Dokras, 2008; Jameson *et al.*, 2016).

As tentativas de ultrapassar a incapacidade de conceber naturalmente iniciaram anteriormente, mas foi com o nascimento de Louise Brown, em 1978, que surgiu uma nova era na área da Procriação Medicamente Assistida (PMA) (Kamel, 2013). O constante desenvolvimento das técnicas de PMA permitiu a disseminação desta área como valência clínica para o tratamento de problemas de fertilidade, solucionando os problemas de inúmeros casais. Os últimos dados comunicados pela Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) dão conta de que 8 milhões de crianças tenham nascido em resultado de tratamentos de PMA (ESHRE, 2018).

O estilo de vida atual será, em parte responsável pelo maior recurso a esta área; o adiamento da maternidade, em detrimento da vida profissional ou de maior estabilidade económica, faz com que os casais se deparem mais tardiamente com eventuais dificuldades em conceber que poderão ser, inclusivamente, potenciadas pela idade. A idade da mulher é dos principais fatores de risco na fertilidade feminina, sobretudo devido à diminuição da quantidade e da qualidade dos oócitos disponíveis no ovário, que pode também ser influenciada por fatores genéticos e ambientais (Rasool and Shah, 2017). A idade masculina é um fator que tem sido cada vez mais valorizado como tendo influência na fertilidade. Embora não haja uma noção clara do efeito da idade na qualidade seminal supõe-se que os danos acumulados no ADN, a exposição a contaminações ambientais, infeções, alterações hormonais e um envelhecimento das glândulas anexas sejam as causas das alterações da qualidade dos espermatozoides (Hauser, 2006; Ausmees *et al.*, 2013; Eisenberg and Meldrum, 2017)-

A fertilidade pode ser afetada pelos hábitos quotidianos. A condição física, particularmente os índices de massa corporal extremos, tem impacto negativo na fertilidade devido às alterações dos níveis hormonais que implicam (Broughton and Moley, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). O *stress* é outro fator com forte influência na fertilidade; de notar que ao enveredar por tratamentos de fertilidade, deve ser oferecido ao casal aconselhamento psicológico uma vez que a infertilidade por si só, bem como os tratamentos a que serão sujeitos, podem causar níveis elevados de *stress* (NICE, 2013), sendo necessária uma grande capacidade de gestão emocional e de recursos.

Paralelamente, as condições ambientais a que a população está sujeita atualmente, particularmente no que respeita à redução da qualidade do ar com contaminantes, têm influência negativa na qualidade dos gametas (Carré *et al.*, 2017). Uma preocupação crescente é a dos disruptores endócrinos, substâncias que têm sido extensivamente estudadas devido aos potenciais efeitos negativos na saúde humana, em particular na saúde reprodutiva (Sifakis *et al.*, 2017).

O consumo de drogas sociais, como o álcool e o tabaco têm forte impacto na fertilidade feminina e masculina, interferindo com o equilíbrio hormonal e a qualidade dos gametas. Estas substâncias manifestam inclusive influência negativa no sucesso de tratamentos de PMA, influenciando a qualidade do desenvolvimento embrionário e até do desenvolvimento fetal (Alvarez, 2015; Kovac *et al.*, 2015).

O investimento contínuo na investigação nesta área proporcionará melhores métodos que permitam solucionar os problemas do número crescente de casais que procuram ajuda no tratamento de infertilidade.

1.1 Infertilidade conjugal – Abordagem e Avaliação

Quando um casal se depara com dificuldade em engravidar e consulta um centro de PMA ambos os membros do casal devem ser avaliados na tentativa de desvendar qual o fator de infertilidade que os afeta. A avaliação da infertilidade do casal é iniciada após um ano de tentativa de conceção, e em casais em que a mulher tem idade avançada (superior a 35 anos) o diagnóstico é geralmente iniciado após seis meses de relações sexuais desprotegidas no período fértil (Quaas and Dokras, 2008). Se algum dos membros do casal apresentar alguma patologia que se mostre um fator de risco para infertilidade a avaliação é iniciada de imediato (NICE, 2013).

O clínico deve conhecer a história clínica do casal, devendo ter-se em consideração a duração da infertilidade e a existência de gravidezes anteriores, abortamentos ou outras complicações, o desenvolvimento do aparelho reprodutor na puberdade, a regularidade dos ciclos menstruais, os métodos de contraceção utilizados

e a frequência do coito, o histórico cirúrgico e de infeções sexualmente transmissíveis, sintomas ou doenças relacionadas com o aparelho reprodutor [DIP (Doença Inflamatória Pélvica), varicocelo, entre outras] ou patologias endócrinas (patologia da tiroide, hiperprolactinemia, entre outros). É ainda feito um levantamento dos hábitos de consumo de álcool, tabaco e drogas e dos hábitos alimentares. O exame físico é importante para despistar anormalidades tiroideias, anormalidades testiculares, alterações na região pélvica ou abdominal, anormalidades na região cervical ou vaginal; é relevante a avaliação do tamanho, posição e sanidade do útero. Os antecedentes familiares de infertilidade ou defeitos à nascença também são relevantes (ASRM, 2006; Quaas and Dokras, 2008; Jameson *et al.*, 2016).

Esta análise inicial do histórico do casal elucida o clínico da provável causa de infertilidade, para que as avaliações posteriores sejam mais específicas.

1.1.1 Elemento masculino

A avaliação da fertilidade masculina inicia com um espermograma, uma avaliação da qualidade espermática. Esta análise requer a recolha do sémen por masturbação. O espermograma é um estudo citomorfobioquímico que envolve a avaliação de parâmetros microscópicos, como a concentração de espermatozoides no sémen e a avaliação da sua vitalidade, motilidade e morfologia – atributos que são importantes na função dos espermatozoides – e parâmetros macroscópicos como o volume de ejaculado, o pH do sémen, a cor, o cheiro e o tempo e grau de liquefação. Os parâmetros avaliados refletem a produção de espermatozoides no testículo e a permeabilidade do sistema de ductos pós-testicular bem como a atividade secretora das glândulas anexas (próstata, vesícula seminal e glândulas bulbo-uretrais) (WHO, 2010) mas mostram-se limitados como medida do potencial de fertilização dos gametas masculinos (Rivera and Garrido, 2018).

Os resultados obtidos são comparados com os valores de referência determinados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2010) (**Tabela 1**) e permitirão não só perceber se o fator masculino contribui para a infertilidade do casal, mas também decidir qual a via de tratamento mais adequada. O diagnóstico de normozoospermia é concedido quando os valores obtidos no espermograma encontram ou superam os valores de referência. No entanto quando algum dos parâmetros não encontrar os valores de referência podem ser atribuídos diagnósticos específicos: para o caso da concentração, é dado o diagnóstico de oligospermia (de ligeira a grave) ou azoospermia (ausência completa de espermatozoides); no caso da morfologia, o

diagnóstico será de teratozoospermia e para a motilidade progressiva o diagnóstico será de astenozoospermia (WHO, 2010).

Na interpretação dos resultados deve ter-se em consideração que a qualidade do sémen depende da produção de espermatozoides pelo testículo, das secreções das glândulas anexas e de episódios de doença recentes, particularmente febris, e ainda fatores como o tempo de abstinência sexual e determinados medicamentos. Estes dados devem ser notados e valorizados na interpretação dos resultados (WHO, 2010).

A qualidade seminal tem uma variação individual ao longo do tempo, sendo recomendado que a avaliação do paciente tenha em consideração mais que um espermograma, idealmente duas a três análises (WHO, 2010). A repetição dos espermogramas deve ser feita com intervalos de três meses para garantir a formação completa dos espermatozoides, salvo no caso de azoospermia ou oligospermia grave, em que a repetição da avaliação deve ser feita o mais rápido possível (NICE, 2013).

Em caso de azoospermia, que pode ser secretora – quando não há produção de espermatozoides nas gónadas por disfunções na espermatogénese ou devido a desequilíbrio hormonal – ou obstrutiva – quando alguma condição anatómica ou falha na ejaculação impede a expulsão de espermatozoides (Hwang *et al.*, 2018) – o elemento masculino do casal poderá ser encaminhado para um médico urologista que fará a avaliação da possibilidade de realização de uma biópsia testicular. Caso sejam encontrados espermatozoides no tecido biopsado, poderá ser feita a sua criopreservação para posterior utilização em ciclos de PMA (*Introdução – 2.2.2. Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides*). A criopreservação de espermatozoides também pode ser realizada para preservação de fertilidade – o tratamento de determinadas doenças, nomeadamente do foro oncológico, compromete a qualidade espermática podendo mesmo cessar a produção de espermatozoides (Depalo *et al.*, 2016); aos pacientes pode ser sugerida, por este motivo, a criopreservação de gâmetas antes do início do tratamento para posterior uso num ciclo de PMA.

Tabela 1. Valores de referência para os parâmetros avaliados num espermograma, definidos pela OMS (WHO, 2010).

Parâmetros macroscópicos	Volume	$\geq 1,5\text{ml}$	
	pH	7,2 – 8	
	Cor	Cinzento opalescente	
	Cheiro	<i>Sui generis</i>	
	Viscosidade	<i>Sui generis</i>	
	Liquefação	Completa em $\approx 15'$ (60' no máximo)	
Parâmetros microscópicos	Concentração	$\geq 15 \times 10^6 / \text{ml}$	
	Número de espermatozoides	$\geq 39 \times 10^6 / \text{ejaculado}$	
	Motilidade	Total	$\geq 40\%$
		Progressiva	$\geq 32\%$
	Vitalidade	58%	
	Morfologia	$\geq 4\%$ espermatozoides normais	
	Aglutinação	Ausente	
	Células imaturas	$\leq 3\%$	
	Número de Leucócitos	$\leq 10^6$	

1.1.2 Elemento feminino

A infertilidade feminina pode estar associada a um fator ovulatório, um fator tubar, infeções bacterianas ou virais ou outras patologias como endometriose.

A disfunção ovulatória manifesta-se geralmente através de períodos menstruais irregulares (oligomenorreia) ou inexistentes (amenorreia). Para avaliar a função ovulatória é geralmente realizada a quantificação de progesterona sérica a meio da fase lútea, mesmo com histórico de períodos menstruais regulares (NICE, 2013).

A avaliação da reserva ovárica, a medida da quantidade e qualidade dos oócitos disponíveis no ovário, é importante. A idade da mulher deve ser dos primeiros pontos a ter em conta neste tópico já que a idade avançada, bem como antecedentes de cirurgia ovárica, impõe maior risco de função ou reserva ovárica diminuída (Quaas and Dokras, 2008) – a mulher tem períodos menstruais regulares, no entanto a resposta à estimulação ovárica e a fecundidade são reduzidas, em comparação com mulheres de idade comparável (ASRM, 2015). A avaliação da reserva ovárica pode ser feita através da contagem de folículos antrais totais, da quantificação da hormona anti-Mülleriana ou da quantificação de FSH (NICE, 2013).

Em caso de períodos menstruais irregulares o diagnóstico poderá enquadrar-se numa das categorias de disfunção ovulatória definidas pela OMS: I – falência do eixo hipotálamo-hipófise; grupo II – disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-ovário; III – falência ovárica (NICE, 2013).

Devido à forte regulação hormonal no eixo hipotálamo – hipófise – ovário, o doseamento hormonal é fulcral no diagnóstico do fator de infertilidade. A quantificação de estrogénios e gonadotrofinas (FSH e LH) permite a classificação do tipo de disfunção ovulatória, mas é rotineiramente complementada com a quantificação da hormona anti-Mülleriana (AMh) (NICE, 2013; Fauser, 2014).

O fator tubar de infertilidade pode estar associado a uma obstrução das trompas, à existência de adesões, à DIP¹, endometriose, gravidez ectópica, a antecedentes de cirurgia pélvica ou abdominal e abortos induzidos, entre outros (Briceag *et al.*, 2015).

Para avaliar a contribuição deste fator para o caso de infertilidade, se não houver historial de DIP, gravidez ectópica ou endometriose, geralmente o clínico recorre a uma histerossalpingografia, um teste pouco invasivo que permite a visualização radiográfica do canal cervical, da cavidade uterina e do lúmen das trompas. Através da utilização de uma solução contrastante este exame avalia a permeabilidade das trompas de Falópio. No caso de estas patologias constarem do historial da paciente o clínico recorre a uma laparoscopia, um procedimento cirúrgico que permite a inspeção intra-abdominal do aparelho reprodutor. É mais invasivo, mas apresenta um maior poder de diagnóstico e tratamento de doença ou disfunção tubar, como endometriose ou adesões, e de outras patologias pélvicas (NICE, 2013; Jameson *et al.*, 2016).

É ainda recomendado um despiste de infeção com *Chlamydia trachomatis* e deve ser oferecido o devido apoio ao casal na gestão do tratamento (NICE, 2013). Esta bactéria é sexualmente transmissível e, se não for eliminada atempadamente, pode disseminar-se no aparelho reprodutor feminino causando a DIP. Se a infeção atingir as trompas de Falópio poderá provocar inflamação, danos e cicatrizes nos tecidos. Admite-se que a maioria dos casos de infertilidade de causa tubar surjam em consequência de uma infeção deste tipo. As bactérias patogénicas mais associadas à DIP e ao fator tubar de infertilidade são a *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae* (Tsevat *et al.*, 2017).

A endometriose é uma patologia caracterizada pela presença de tecido endometrial no exterior da cavidade uterina. Representa uma das disfunções

¹ A DIP é definida como uma inflamação do trato genital superior feminino que afeta o útero, trompas de Falópio e ovários. É geralmente provocado por uma infeção bacteriana transmitida sexualmente (Jennings and Krywko, 2019).

ginecológicas mais frequentes, afetando mais de 30% das mulheres inférteis (Ciarmela *et al.*, 2013). É um problema com um forte impacto na saúde feminina, incluindo na fertilidade (Ciarmela *et al.*, 2013; NICE, 2017).

O teste pós coital, que atualmente não é recomendado por rotina, era utilizado para avaliar a interação dos espermatozoides com o muco cervical, uma barreira efetiva aos gametas masculinos. Este teste permitia despistar o fator cervical de infertilidade, que se deveria à incapacidade dos espermatozoides de atravessar o muco cervical e atingir o ócito para o fecundar (NICE, 2013; Nakano *et al.*, 2015).

A avaliação do casal inclui um despiste de infeções virais, como o VIH, hepatite B e C e, no caso de os resultados serem positivos para qualquer uma destas infeções, deve ser-lhes oferecido o devido acompanhamento e aconselhamento (NICE, 2013).

O resultado das avaliações permite à equipa médica discutir com o casal qual o tratamento de procriação medicamente assistida mais adequado para o seu caso.

2. Procriação medicamente assistida

A aplicação de técnicas de PMA constituem, segundo a legislação portuguesa, um método subsidiário e não alternativo de procriação podendo ser aplicadas mediante diagnóstico de infertilidade ou para tratamento de doença grave ou de risco de transmissão de doenças de origem genética, infecciosa ou outras. Numa atualização mais recente da lei, o recurso a PMA foi estendido a todas as mulheres, independentemente do diagnóstico de infertilidade (“Lei nº 58/2017 ‘Procriação Medicamente Assistida,’” 2017).

Os tratamentos disponíveis podem dividir-se em duas categorias: a fertilização *in vivo*, que caracteriza a fecundação que ocorre intracorporalmente, nas trompas de Falópio, e a fertilização *in vitro*, que designa as técnicas que implicam a união dos gametas feminino e masculino em laboratório. Geralmente os tratamentos são iniciados por ordem crescente de invasibilidade, isto é, o casal inicia o tratamento de infertilidade com o procedimento menos invasivo e, na ausência de resultado favorável, prosseguirá para procedimentos mais complexos (Stevenson and Sloane, 2017). Em alguns casos pode ser necessário avançar diretamente para procedimentos mais complexos, se a idade dos membros do casal, os fatores de infertilidade investigados, os custos e as taxas de sucesso dos tratamentos disponíveis e eventuais dados de ciclos realizados anteriormente assim o justificarem.

2.1 Inseminação intrauterina

A inseminação intrauterina (IIU) é considerada um tratamento de primeira linha, isto é, menos invasivo. Consiste na introdução de espermatozoides do cônjuge ou de um dador, consoante o diagnóstico do fator de infertilidade, no útero com recurso a um cateter de inseminação. Este procedimento será o primeiro a ser realizado em caso de infertilidade idiopática (Stevenson *et al.*, 2016).

Tem a vantagem de depositar no útero uma grande concentração de espermatozoides (**Figura 1**) com boa motilidade e de morfologia normal ultrapassando a barreira natural do canal cervical e reduzindo o trajeto dos gâmetas masculinos até ao oócito (Stevenson *et al.*, 2016). A IIU poderá ser a solução em casos de infertilidade de fator cervical.

Idealmente a inseminação será meticulosamente coordenada com a ovulação, que poderá ser controlada por ultrassonografia, avaliando o desenvolvimento folicular, ou através da medição da LH no período pré-ovulatório. Esta técnica pode ainda ser coordenada com uma estimulação hormonal da ovulação de modo que mais folículos entrem em maturação e produzam oócitos capazes de serem fertilizados. A indução hormonal será particularmente útil em mulheres oligo ou anovulatórias (Stevenson *et al.*, 2016).

A indução da ovulação pode ser utilizada isoladamente, numa fase inicial, para que o casal realize o coito programado.

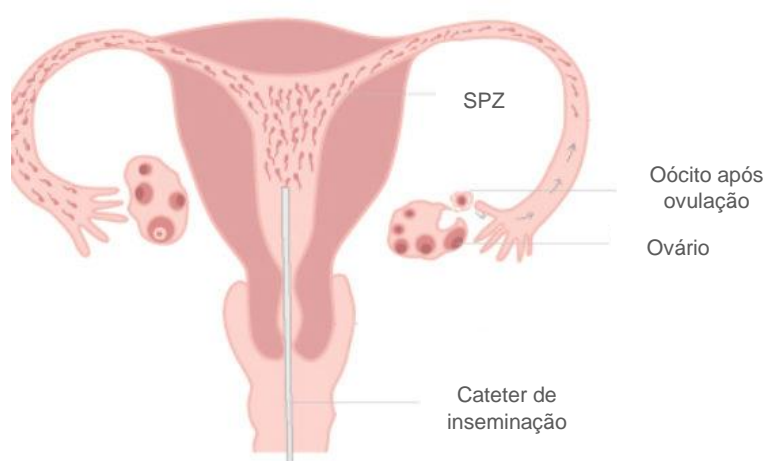


Figura 1. Representação esquemática da inseminação intrauterina. Após o processamento da amostra seminal para capacitação espermática, os espermatozoides (SPZ) são depositados no útero, com auxílio de um cateter, ultrapassando a barreira cervical. Os espermatozoides seguem o curso natural até à trompa onde encontrarão o oócito para fecundação. [Adaptado de <http://www.drganpenang.com/frequently-asked-questions-on-intrauterine-insemination/> (consultado a 04/08/2019)].

2.2 Fertilização *in vitro*

A fertilização *in vitro* (FIV) designa todas as técnicas que impliquem a união artificial do espermatozoide com o oócito.

Um procedimento de FIV envolverá sempre a estimulação hormonal da ovulação com gonadotrofinas que induzirão a maturação de múltiplos folículos com oócitos passíveis de serem fertilizados. Este desenvolvimento é monitorizado ultrassonograficamente e quando os folículos atingem um determinado tamanho (Abbara *et al.*, 2018) é administrada uma injeção da hormona gonadotrofina coriônica humana (hCG) – que induz a maturação final e o resumo da meiose no oócito (Orvieto, 2015). Cerca de 36 horas depois da injeção de hCG os folículos terão completado a maturação – encontrando-se em fase de meiose II (MII) – e estarão prontos a ser recuperados, num procedimento designado punção folicular. Este procedimento consiste na recuperação de complexos *cumulus* – *coroa radiata* – oócito (CCO) diretamente do ovário, por aspiração, após punção com uma agulha transvaginal ecoguiada. Estes são manipulados em laboratório até estarem aptos para a inseminação com espermatozoides do cônjuge ou de um dador. Posteriormente é avaliada a fecundação e acompanhado o desenvolvimento embrionário até ao momento da transferência para o útero.

Em qualquer uma das técnicas de PMA a utilização de espermatozoides requer o seu processamento, a partir da amostra colhida por ejaculação ou de uma amostra congelada, para que sejam eliminados o plasma seminal, que contém fatores descapacitantes, espermatozoides degenerativos e outras células que possam produzir substâncias nocivas para os espermatozoides (Bourne and Archer, 2018).

2.2.1 FIV convencional

A fertilização *in vitro* convencional consiste na cocultura dos espermatozoides e dos oócitos em laboratório (**Figura 2**), num meio de cultura apropriado. (Stevenson *et al.*, 2016).

Ao implicar a punção folicular com anestesia geral este procedimento é considerado mais invasivo para a mulher (Stevenson *et al.*, 2016).

O recurso a FIV convencional deverá prevalecer, na ausência de fator masculino de infertilidade por se tratar de um processo menos invasivo para o oócito com equivalente taxa de sucesso. Quando se verifica um maior risco de falha de fecundação, por suspeita de imaturidade oocitária, pode em teoria sugerir-se o recurso a FIV convencional – o tempo de incubação a que os oócitos são sujeitos, em cocultura com

os espermatozoides, permite a maturação dos oócitos imaturos e a sua fecundação, podendo evitar a falha de fecundação total (Ming *et al.*, 2015). A falha de fecundação está sobretudo relacionada com a estimulação ovárica, que rende um menor número de oócitos maduros, calculando-se que a microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides seja utilizada desnecessariamente em alguns casos para prevenir a falha de fecundação (Lee *et al.*, 2017).

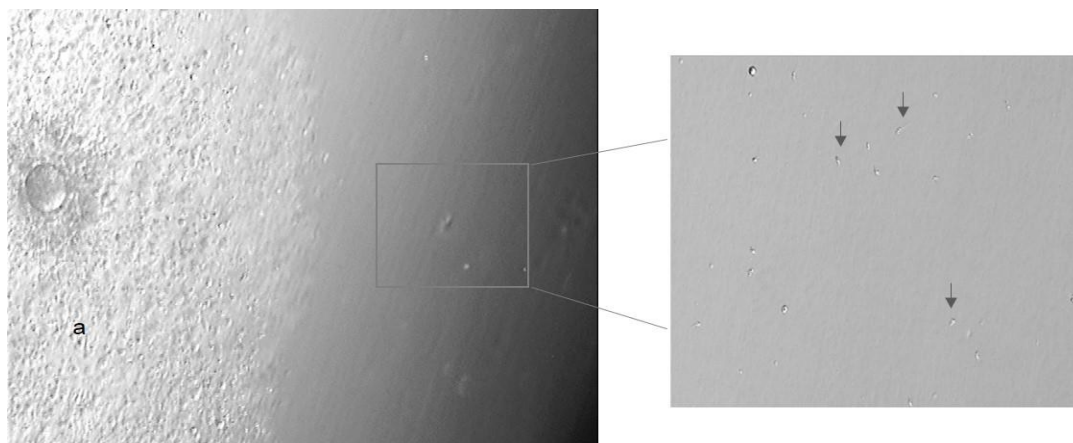


Figura 2. Fertilização *in vitro* convencional. O oócito envolvido pelas células do *cumulus* (a) é mantido em cocultura com os espermatozoides (alguns exemplares assinalados na figura pelas setas) (Imagem cedida pela UMR do CHUSJ).

2.2.2 Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

É um procedimento de fertilização *in vitro* alternativo à FIV convencional. A ICSI consiste na injeção de espermatozoides no interior do(s) oócito(s) recuperado(s) na punção folicular que apresentem maturação nuclear. A avaliação da maturação nuclear é realizada após a desnudação enzimática dos complexos CCO e observação da presença do primeiro glóbulo polar (GP) no oócito, indicando que se encontra em fase MII (**Figura 3**).

Este procedimento é realizado num microscópio invertido, que permite a seleção dos espermatozoides com melhor morfologia, indicadora de melhor qualidade. De notar que a seleção dos espermatozoides é feita pelo embriologista com base no conhecimento atual sobre os parâmetros indicadores da qualidade do espermatozoide, sendo por isso uma seleção subjetiva (Sakkas *et al.*, 2015).

A injeção de espermatozoides implica maior manipulação do oócito que a FIV convencional sendo por isso mais invasiva (**Figura 3**) e podendo resultar num maior número de oócitos degenerados após o procedimento (Ming *et al.*, 2015). É, no entanto, considerada uma técnica segura, com uma probabilidade de gerar embriões de boa

qualidade semelhante à FIV convencional (Ming *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017), que poderá ser uma opção no caso de um fator masculino de infertilidade grave (oligospermia grave ou azoospermia) (Huang *et al.*, 2015; Stevenson *et al.*, 2016). A microinjeção de espermatozoides poderá ser recomendada no caso de, após processamento da amostra masculina, os espermatozoides apresentarem reduzida motilidade progressiva, que seria desvantajosa para uma FIV convencional. Como mencionado anteriormente, em caso de azoospermia o elemento masculino do casal poderá ser encaminhado para um médico urologista para realização de uma TESE² (do inglês *testicular sperm extraction*). Posteriores ciclos com recurso a espermatozoides criopreservados terão de ser realizados com ICSI (Neri *et al.*, 2018).

Se o número de oócitos recuperados na punção folicular for reduzido, recomenda-se também a inseminação com recurso a ICSI, com o intuito de diminuir o risco de falha de fecundação (Ming *et al.*, 2015).

A criopreservação de oócitos é uma técnica importante na preservação de fertilidade feminina, por exemplo, no entanto o processo de vitrificação promove a expulsão dos grânulos corticais oocitários para a zona pelúcida (ZP), conduzindo ao seu endurecimento e inviabilizando a penetração pelos espermatozoides. Desta forma em ciclos com desvitrificação de oócitos a ICSI deve ser a técnica de inseminação selecionada (Neri *et al.*, 2018).

Esta técnica é ainda um valioso recurso quando, em ciclos de FIV convencionais anteriores, tenha havido falha de fecundação – geralmente um sinal de falta de reconhecimento do oócito pelo espermatozoide (Bernabò *et al.*, 2014; Miller, 2015), podendo explicar a infertilidade do casal.

² A técnica de TESE consiste na extração de tecido testicular, através de uma biópsia, a partir do qual se isolam espermatozoides para criopreservação (Rajfer, 2006).



Figura 3. Técnica de ICSI. **Esquerda:** a posição do oócito é fixada com a pipeta de sustentação (à esquerda) e o espermatozoide selecionado é aspirado e mantido na extremidade da pipeta de injeção (à direita), que se aproxima do oócito maduro (MII) – a injeção é realizada perpendicularmente à posição do GP de modo a evitar danos no fuso acromático. **Direita:** a pipeta de injeção penetra no oócito e, quando esta atinge o centro do oócito aproximadamente, a oolema rompe. Com a pipeta de injeção é realizada uma aspiração e reexpulsão do citoplasma oocitário, importante para a ativação do oócito e para garantir que o espermatozoide se envolve no citoplasma e não é removido quando a pipeta é retirada. Adaptado (Neri *et al.*, 2018).

2.3 Fecundação e Desenvolvimento embrionário

A fecundação após FIV convencional acontece de forma semelhante ao processo natural – os espermatozoides são atraídos para o oócito por reações quimiotáticas e iniciam a penetração da ZP através da libertação de enzimas proteolíticas (libertadas do acrossoma) e do próprio movimento da cauda. Com isto, inicia-se uma reação que leva à libertação do ião cálcio (Ca^{2+}) dos grânulos corticais para o espaço perivitelino; as moléculas libertadas alteram a permeabilidade da membrana do oócito e da zona pelúcida inibindo a polispermia³. As membranas celulares do oócito e do espermatozoide fundem-se e a libertação de Ca^{2+} permite o resumo da meiose II – o oócito bloqueado em metáfase II termina este processo, culminando na libertação do segundo GP. Os cromossomas do núcleo do oócito descondensam, originando o PN feminino, e o núcleo do espermatozoide expande, originando o PN masculino (Moore *et al.*, 2016a). Ambos os PN acabam por se justapor no centro e aumentar de tamanho e os percursos nucleolares organizam-se junto de local de união dos PN (Ebner, 2018).

³ Penetração do oócito por mais que um espermatozoide, fenómeno associado a desequilíbrios genéticos relacionados com um desenvolvimento anormal (Carlson, 2014).

A avaliação da fecundação consiste na verificação dos seguintes parâmetros (**Figura 4**) (ASEBIR, 2015):

- Número de PN, a sua simetria, sincronia e localização;
- Número de GP, a sua aparência e localização em relação aos PN;
- Número de percursos nucleolares, a sua simetria e polarização;
- Aspeto de um eventual halo citoplasmático.

A avaliação da fecundação respeita a sequência destes acontecimentos e é, por isso realizada 16 a 18 horas depois da inseminação no caso da ICSI e 18 a 20 horas depois no caso de FIV (Nagy, 2017). Estas diferenças nos tempos de avaliação devem-se à natureza dos dois procedimentos: a FIV convencional será o procedimento que mais se assemelha à fertilização natural, enquanto a ICSI é mais invasiva. A ICSI permite ao espermatozoide ultrapassar a barreira da ZP, estando demonstrado que a fusão do espermatozoide com o citoplasma do oócito acontece rapidamente. Por outro lado, a FIV convencional estará associada a um maior intervalo de tempo até à fecundação, uma vez que o contacto do espermatozoide com o oócito não é imediato, e este terá de ultrapassar a *coroa radiata* e a ZP (Neri *et al.*, 2014; Ebner, 2018).



Figura 4. Zigoto com características de uma correta fecundação. Observar a localização central dos dois PN, bem como a polarização dos percursos nucleolares no interior dos PN, e a presença dos dois GP no espaço perivitelino (ASEBIR, 2015).

Após esta avaliação, os embriões que apresentem correta fecundação são mantidos em cultura *in vitro* e o seu desenvolvimento é acompanhado por um embriologista. A avaliação pode ser feita por observação diária num microscópio ou através de um sistema de monitorização por *time-lapse*. Esta última tecnologia, através da introdução de câmaras no interior das incubadoras e da captura de imagem em

intervalos de tempo definidos, permite a reconstrução do desenvolvimento embrionário em vídeo. O *time-lapse* demonstra ser vantajoso ao permitir o acompanhamento do dinamismo do desenvolvimento embrionário, apurando a seleção embrionária, sem a necessidade de perturbar as condições ótimas de desenvolvimento dos embriões (Kovacs, 2014).

O desenvolvimento embrionário é monitorizado e a sua morfologia é avaliada diariamente; embora subjetiva a morfologia é um indicador de euploidia (Majumdar *et al.*, 2017) e permite eliminar embriões com mau prognóstico (Elder and Dale, 2001). A classificação e seleção embrionária é realizada segundo diferentes parâmetros, consoante a escola de classificação que é preferida pelo centro de PMA (ESHRE, 2011; Puga-Torres *et al.*, 2017), mas de um modo geral, para embriões em clivagem, a apreciação da forma, tamanho e número de blastómeras, do grau de fragmentação e compactação celular e da presença de multinucleação refletem a sincronia da clivagem e a qualidade do embrião (**Figura 5, A e B**). A avaliação de blastocistos tem em conta outras características da célula como o tamanho e a compactação da massa celular interna (MCI), a compactação e a homogeneidade das células da trofoectoderme (TFE) e o grau de expansão do blastocélio (BC) e da ZP (**Figura 5, C**) (ESHRE, 2011; ASEBIR, 2015).

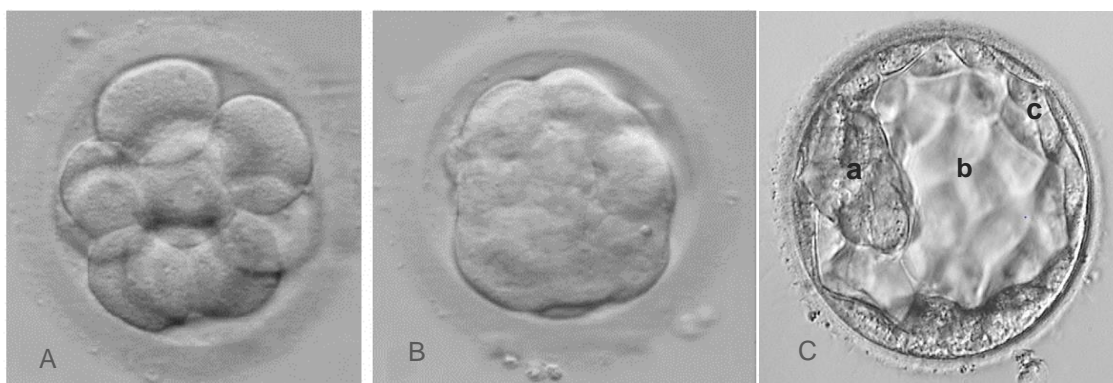


Figura 5. Desenvolvimento embrionário. **A.** Embrião em clivagem (dia 3) com início de adesão celular. **B.** Mórula com compactação celular completa (dia 4). Adaptado (ASEBIR, 2015). **C.** Blastocisto expandido (dia 5 ou dia 6) sendo visível a MCI compactada (a), a trofoectoderme (c) homogénea e com múltiplas células e o blastocélio (b) expandido (Imagem cedida pela UMR do CHUSJ).

3. Transferência embrionária

Após o acompanhamento do desenvolvimento embrionário *in vitro* os embriões de melhor qualidade são candidatos a transferência para o ambiente uterino. A transferência é realizada geralmente entre o 2º e o 5º dia de desenvolvimento, depositando o embrião no fundo da cavidade uterina com auxílio de um cateter de transferência. São transferidos para o útero um ou dois embriões; em casos excepcionais poderão ser transferidos três embriões (Stevenson *et al.*, 2016; Penzias *et al.*, 2017b).

A transferência embrionária será dos passos mais críticos num ciclo de tratamento de infertilidade. O sucesso da transferência está dependente de numerosas variáveis e a otimização deste passo é crucial na obtenção de implantação e no sucesso do ciclo.

3.1 Fisiologia da implantação embrionária

O estabelecimento de uma gravidez é um processo complexo que envolve a decidualização do endométrio uterino e a implantação embrionária. As hormonas ováricas, o estrogénio e a progesterona, e as variações coordenadas dos seus níveis no organismo são os principais responsáveis pelo controlo de todas as alterações que acontecem no ambiente uterino e que culminam, idealmente, em gravidez.

3.1.1 Decidualização do endométrio

O endométrio uterino, a camada luminal da parede uterina, sofre alterações estruturais cíclicas durante o ciclo menstrual. Os níveis hormonais no endométrio têm um reflexo direto na sua função, podendo dividir-se o ciclo uterino em duas fases, a fase proliferativa e a fase secretora. A fase proliferativa, que se segue à menstruação e antecede a ovulação, coincide com a fase folicular do ciclo ovário durante a qual os folículos em desenvolvimento produzem estrogénio. Os níveis crescentes de estrogénio promovem a proliferação das células epiteliais, das células do estroma e endotélio vascular permitindo a regeneração e o espessamento do endométrio e conduzem ainda a uma alteração na expressão de genes, nomeadamente da expressão do recetor da progesterona, preparando o endométrio para a posterior fase secretora (Zhu *et al.*, 2014; Su-Mi and Jong-Soo, 2017; Okada *et al.*, 2018). Durante a fase secretora, que se segue à ovulação, a concentração de progesterona aumenta, em consequência da sua produção pelo corpo lúteo em crescimento no ovário. É neste período que o endométrio se torna recetivo à implantação (Su-Mi and Jong-Soo, 2017). A ação do estrogénio

durante a fase secretora é também essencial no processo de implantação, sendo que nesta fase o estrogénio cessa a proliferação das células epiteliais e estimula a diferenciação (Robertshaw *et al.*, 2016).

A progesterona provoca a diferenciação celular nas células cuja proliferação foi previamente induzida pelo estrogénio (Zhu *et al.*, 2014). A progesterona atua, por um lado, sobre os recetores de progesterona existentes nas células epiteliais do endométrio induzindo a perda de microvilosidades, a diminuição da adesão célula a célula e o desenvolvimento de pinópodes, protrusões celulares que inibem a adesão célula a célula durante a janela de implantação (*Introdução – 3.1.2 Implantação embrionária*), aumentando a recetividade do endométrio para um blastocisto (Su-Mi and Jong-Soo, 2017). As células epiteliais glandulares são ainda induzidas a produzir fatores promotores de implantação que são lançados na cavidade uterina, deixando as células epiteliais no lúmen uterino recetivas à implantação (Zhu *et al.*, 2014).

A diferenciação celular induzida pela progesterona denomina-se decidualização e consiste num processo cíclico, dependente da variação cíclica dos níveis hormonais e independente da implantação, mas cuja manutenção implica a existência de um embrião (Zhu *et al.*, 2014). A inexistência de um embrião provoca a redução dos níveis de progesterona, iniciando a cascata de eventos que levam à descamação do endométrio – menstruação.

A decidualização do endométrio caracteriza-se por fenómenos angiogénicos – as artérias espirais uterinas sofrem enrolamentos e invaginações – entre outras alterações vasculares, pelo recrutamento de células do sistema imunitário para o endométrio (células NK, linfócitos-T e macrófagos) e pela produção de citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas, entre outras hormonas e enzimas, que são importantes para a implantação e desenvolvimento embrionário (Singh *et al.*, 2011a; Moore *et al.*, 2016b; Su-Mi and Jong-Soo, 2017). Estas substâncias são produzidas quer pelo tecido endometrial quer pelo trofoblasto do blastocisto em invasão pelo que o processo de implantação se baseia numa conversa molecular entre as duas entidades (**Figura 6**).

A decidualização manifesta-se ainda na morfologia das células do estroma uterino. Estas transitam de um aspeto alongado e com reduzida quantidade de citoplasma, característico da fase proliferativa, para uma conformação arredondada, com expansão do citoplasma e acumulação de glicogénio e gordura, passando a designar-se células deciduais (Gellersen and Brosens, 2014).

Falhas no processo de decidualização terão implicação no sucesso da implantação: o processo de decidualização caracteriza-se pela transição de uma fase inflamatória, em que o endométrio se encontra recetivo à implantação, para uma fase anti-inflamatória, durante a qual o endométrio aumenta a seletividade e a capacidade de suportar uma gravidez (Murakami *et al.*, 2018). As células deciduais são importantes no reconhecimento e seleção do embrião, sendo responsáveis por envolver e interagir com o embrião e capazes de limitar o crescimento de embriões com desenvolvimento comprometido (Gellersen and Brosens, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Uma decidualização deficiente poderá ainda ser a explicação para abortos de repetição. Há dados que demonstram que a diminuição da seletividade embrionária está associada ao aumento da recetividade, com um aumento da implantação de embriões desequilibrados, que resultarão em abortamento (Murakami *et al.*, 2018).

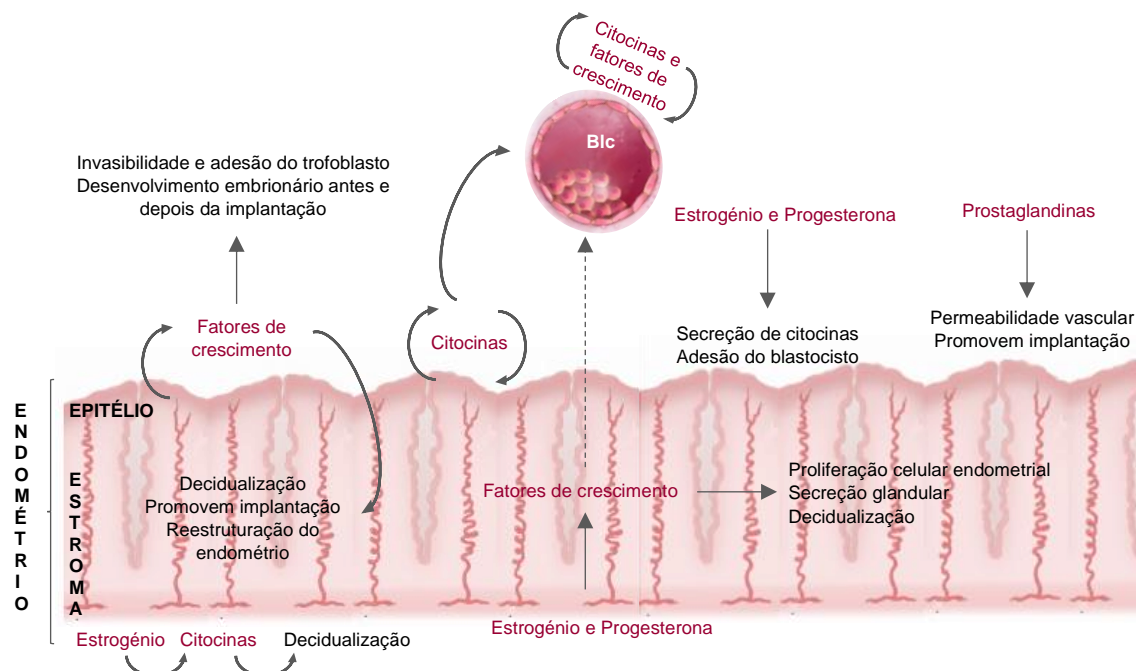


Figura 6. Esquema representativo do conjunto de moléculas produzidas pelo blastocisto (Blc) e pelo endométrio, e o seu papel no sucesso da implantação. Adaptado (Singh *et al.*, 2011a).

3.1.2 Implantação embrionária e desenvolvimento primordial da placenta

A implantação é definida como a anexação e sequente penetração do blastocisto livre da ZP que acontece, geral e preferencialmente, no endométrio uterino aproximadamente 5 a 7 dias após a fecundação (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). O

estabelecimento de uma gravidez exige a sincronização molecular entre o blastocisto capaz de implantação e o útero em estado recetivo.

Dada o conjunto de condições que é necessário reunir, o período em que o útero se encontra no seu estado recetivo é reduzido. A sincronização da recetividade do endométrio uterino e o blastocisto está confinada a um período temporal definido como janela de implantação que ocorre entre o 21º e o 24º dias do ciclo, em ciclos menstruais naturais regulares de 28 dias, isto é, cerca de 5 a 10 dias depois do pico de LH (Sanverdi *et al.*, 2016; Su-Mi and Jong-Soo, 2017). Fora do período recetivo, o embrião não é capaz de interagir com o endométrio de modo a implantar (Singh *et al.*, 2011a).

Durante a janela de implantação, no endométrio, há expressão de um conjunto de genes que codificam moléculas envolvidas numa cadeia de processos que incluem o posicionamento do embrião no fundo uterino, a aposição do blastocisto na superfície do epitélio endometrial, a adesão do blastocisto às células epiteliais e a penetração entre estas células, que culmina na invasão do estroma uterino pelo blastocisto (Gellersen and Brosens, 2014).

Naturalmente o embrião abandona a trompa e avança para a cavidade uterina geralmente entre o 4º e o 5º dia de desenvolvimento, quando se encontra em fase de mórula. O desenvolvimento embrionário prossegue e a mórula inicia a cavitação enquanto as células se vão dividindo e diferenciando para formar duas estruturas: a massa celular interna ou embrioblasto, que dará origem ao feto propriamente dito, e o trofoblasto, um conjunto de células que envolve o embrioblasto e a cavidade do blastocisto (blastocélio) e que dará posteriormente origem às estruturas extraembrionárias e à porção embrionária da placenta. O blastocisto continua a expandir e por fim eclode da zona pelúcida, expondo a trofoectoderme, o primeiro ponto de contacto com o epitélio endometrial (Moore *et al.*, 2016b; Aplin and Ruane, 2017).

À medida que o blastocisto inicia a implantação, o trofoblasto vai diferenciar-se em duas estruturas: o citotrofoblasto, o estrato interno do trofoblasto, com atividade mitótica fruto da qual se geram células que migrarão para a estrutura superficial, o sinciotrofoblasto, perdendo a membrana celular. A camada externa consiste precisamente num sincício, que se expande rapidamente e, através de estruturas protuberantes e da atividade enzimática, invade as células decíduais do endométrio: as microvilosidades do sinciotrofoblasto interagem com os pinópodes do epitélio endometrial, permitindo a adesão do blastocisto (Cole, 2016; Moore *et al.*, 2016b).

O processo de invasão do endométrio envolve ainda fenómenos apoptóticos localizados nas células do epitélio endometrial, promovidos pela interação com o blastocisto (Boeddeker and Hess, 2015; Antsiferova and Sotnikova, 2016). A invasão do

estroma, por seu lado, é dependente da motilidade das células decíduais que se rearranjam para acomodar o blastocisto, acabando por encapsulá-lo (Gellersen and Brosens, 2014). Uma vez invadido o estroma uterino, o epitélio uterino, à superfície, acaba por selar, envolvendo o blastocisto no interior da parede uterina (Cole, 2016; Aplin and Ruane, 2017). As células decíduais continuam a acumular glicogénio e lípidos que contribuem para a nutrição do embrião e proporcionam um ambiente imunologicamente favorável (Moore *et al.*, 2016b). O grau de invasão do trofoblasto é importante para a viabilidade fetal (Su-Mi and Jong-Soo, 2017).

Quando se dá a eclosão do blastocisto, o sinciciotrofoblasto produz a hormona hCG que é conduzida na corrente sanguínea materna tendo efeito endócrino no corpo lúteo, suportando a sua manutenção no ovário. O corpo lúteo em desenvolvimento será responsável pela produção das hormonas sexuais, estrogénio e progesterona, que permitirão o suporte da gravidez. A deteção da hCG é a base teórica do teste de gravidez (Moore *et al.*, 2016b), esta é indiciada pela medição dos níveis de hCG e confirmada ultrassonograficamente. (NICE, 2013; Stevenson *et al.*, 2016).

O hCG que é produzido promove ainda a invasão característica do momento da implantação e tem um efeito positivo na angiogénese uterina e no desenvolvimento da placenta. É ainda indutor do crescimento uterino, da diferenciação do trofoblasto e do relaxamento do miométrio. Tem um papel importante no crescimento fetal e na supressão imunitária e de macrófagos (Cole, 2010).

À medida que a implantação acontece surge entre o embrioblasto e o citotrofoblasto uma pequena cavidade que dará origem à cavidade amniótica que acaba por ser envolvida por um conjunto de células, o âmnio. O embrioblasto, por seu lado, sofre divisões formando-se uma estrutura bilaminar designada disco embrionário que se dividirá mais tarde originando as diferentes estruturas anatómicas fetais (**Figura 7**).

No sinciciotrofoblasto surgem estruturas lacunares que são preenchidas com uma mistura de sangue materno, dos capilares endometriais destruídos, e de detritos celulares das glândulas uterinas rompidas. Este fluído é transferido através do trofoblasto para o disco embrionário, sendo responsável pela sua nutrição. Assim se estabelecem os primórdios da comunicação entre útero e placenta. As lacunas acabam mais tarde por se conectar numa rede lacunar, que originará os espaços intervilosos da placenta (Moore *et al.*, 2016b).

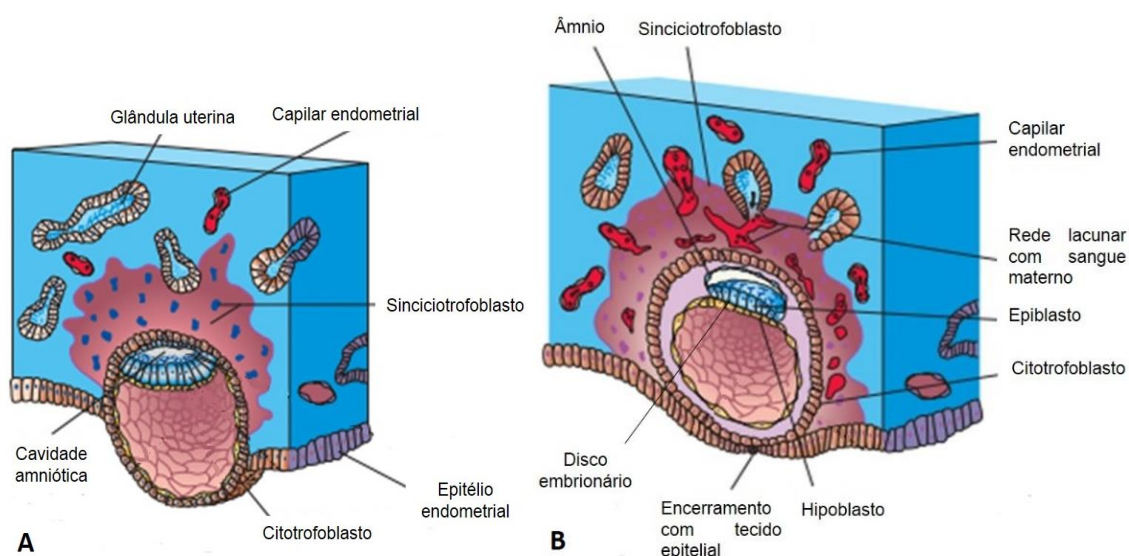


Figura 7. **A.** Esquema representativo da implantação embrionária, com um blastocisto parcialmente aderido ao endométrio uterino, aproximadamente aos 8 dias de desenvolvimento embrionário. **B.** Esquema representativo da implantação embrionária, com um blastocisto em implantação no endométrio uterino, aproximadamente aos 10 dias de desenvolvimento embrionário. Esta fase é caracterizada pela comunicação das lacunas, que se enchem de sangue. Notar a divisão do embrioblasto em epiblasto e hipoblasto, as duas camadas que constituem o disco embrionário. Adaptado (Moore *et al.*, 2016b).

Como será de esperar uma deficiente implantação ou desenvolvimento placentário, muitas vezes associadas a falhas na decidualização (Woods *et al.*, 2018), terão consequências nefastas na gestação, associadas a condições como restrição do crescimento intrauterino, pré-eclampsia e complicações da gravidez que poderão revelar-se mais tardiamente (James *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços das equipas clínicas a falha recorrente de implantação acontece ainda em cerca de 20% dos casos, sendo um dos aspetos mais limitantes nos procedimentos de PMA (Fu *et al.*, 2018).

3.2 O número de embriões e o momento da transferência

Um dos primeiros aspetos a considerar na preparação da transferência embrionária é o número de embriões a ser transferido. A ocorrência de gravidezes múltiplas após tratamentos de infertilidade é frequente e, de facto, uma das causas do aumento da taxa de gemelaridade em países desenvolvidos nas últimas décadas foi atribuída ao maior recurso à PMA (Pison *et al.*, 2015) o que estará sobretudo relacionado com o número de embriões que são transferidos para o útero da mulher (El-Toukhy *et al.*, 2018). As gravidezes múltiplas, inclusive gravidezes gemelares, impõem riscos sérios para a gestante – anemia, diabetes e hipertensão gestacionais, anomalias

placentárias, parto prematuro, cesariana e hemorragia pós-parto – e para o feto – anomalias anatômicas e genéticas, defeitos no crescimento e prematuridade (Santana *et al.*, 2016; Amorosa *et al.*, 2017).

Na tentativa de contornar estes problemas, tem sido incentivada a política de transferência seletiva de um único embrião, de modo a potenciar a gestação única e diminuir o número de gravidezes múltiplas (Penzias *et al.*, 2017b). Esta política implicará um maior número de transferências, uma vez que é transferido apenas um embrião de cada vez, e um intervalo de tempo ligeiramente maior até atingir a gravidez no entanto este é o melhor método de atingir gravidezes únicas (Lee *et al.*, 2016; Voorhis and Mejia, 2017), que acarretam menos riscos para ambas as partes.

A seleção de um único embrião para transferência salienta a importância da identificação do embrião de melhor qualidade e da melhor altura para o transferir, já que o embrião selecionado deverá ser o que tenha maiores hipóteses de implantação (Hatirnaz and Pektas, 2017). A disseminação da política de transferência de um único embrião evidencia a importância das técnicas de criopreservação, de modo a preservar embriões excedentes (*Introdução – 4. Criopreservação*).

Outro aspeto importante na preparação da transferência embrionária é a determinação do momento de transferência. Atualmente a cultura de embriões *in vitro* até ao dia 5 e transferência do embrião em fase de blastocisto é preferida à transferência em dia 3.

A transferência ao 5º dia mimetiza a sequência natural de eventos, havendo maior sincronia entre as condições uterinas e o estágio de desenvolvimento embrionário (Maheshwari *et al.*, 2016). A ativação do genoma embrionário acontece ao 3º dia, na fase de 8 células. Se esta ativação não ocorrer, a probabilidade de sobrevivência e implantação do embrião são muito reduzidas. Para garantir que o embrião que é transferido sofreu este processo o indicado será prolongar a cultura até ao 5º dia, correndo o risco de perder embriões mas assegurando que o embrião desenvolveu convenientemente e há maior probabilidade de implantação (Maheshwari *et al.*, 2016; Hatirnaz and Pektas, 2017). A avaliação morfológica que é realizada rotineiramente nos laboratórios para avaliar a qualidade embrionária só é preditiva de euploidia, até certo ponto, em blastocistos. A qualidade morfológica de embriões em clivagem não é indicativa de euploidia pelo que será prudente acompanhar o desenvolvimento embrionário até ao 5º dia (Majumdar *et al.*, 2017).

A cultura estendida até dia 5 poderá trazer algumas desvantagens. A cultura *in vitro* até uma fase mais avançada do desenvolvimento embrionário poderá provocar alterações genéticas e epigenéticas nas células da trofoectoderme, afetando a

implantação do embrião e aumentando o risco de parto prematuro (Maheshwari *et al.*, 2016). O ambiente de cultura será diferente do ambiente uterino o que poderá provocar a falha de blastulação de alguns embriões, aumentando as taxas de cancelamento de transferência (Martins *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

A recetividade do endométrio (*Introdução – 3.1. Fisiologia da implantação embrionária*) é um importante fator no sucesso da transferência embrionária. Um dos primeiros métodos de determinação da recetividade endometrial foi a análise histológica do endométrio, que veio, no entanto, a demonstrar-se uma técnica imprecisa devido à variabilidade histológica dentro de um mesmo ciclo e à subjetividade associada à observação histológica (Murray *et al.*, 2004). Os pinópodes presentes no endométrio também foram apresentados como marcadores de recetividade endometrial, por serem estruturas abundantes durante a janela de implantação. Por existirem também no endométrio após o encerramento do período recetivo a sua utilização como marcador deixou de ser recomendada (Mahajan, 2015).

Atualmente, a avaliação da recetividade endometrial é geralmente feita ecograficamente, sendo que parâmetros como a espessura do endométrio, o padrão trilaminar do tecido endometrial e o fluxo sanguíneo endometrial e subendometrial podem ser indicadores da recetividade do endométrio. No entanto não há ainda certezas em relação ao recurso a estes critérios como preditivos do resultado da gravidez. A recetividade do endométrio pode ser induzida pela administração de estradiol (um tipo de estrogénio), que estimula a proliferação celular e induz os recetores de progesterona, e de progesterona, que estimula a ação secretora das células endometriais, essencial para a implantação de um blastocisto. Em mulheres com um endométrio de espessura reduzida, em ciclos a fresco, poderá ser feita uma suplementação mais prolongada com estradiol, para aumentar a recetividade do endométrio (Zhang *et al.*, 2018b).

3.3 Aspetos a considerar durante a transferência

O procedimento da transferência embrionária envolve a colaboração da equipa médica com a equipa de embriologia (**Figura 8**), implicando uma série de precauções com os diferentes momentos da transferência, inclusive com os materiais utilizados durante o procedimento.

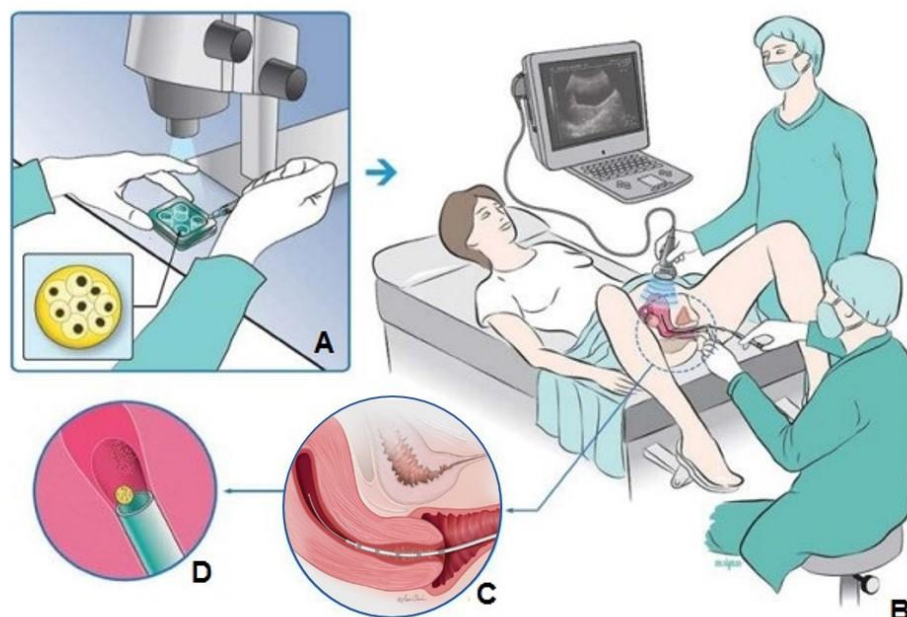


Figura 8. Representação esquemática de uma transferência embrionária sob controle ecográfico transabdominal. Notar a colaboração da equipa envolvida, com a seleção dos embriões para transferência pelo embriologista (A) e a transferência embrionária propriamente dita realizada pelo médico com auxílio de outro profissional de saúde para controlo ecográfico (B). O médico é responsável pelo posicionamento do cateter no fundo da cavidade uterina (C) e pela sua deposição (D). Adaptado (Mariani and Bellver, 2017; Cutting, 2019).

- **Transferência-teste**

A transferência embrionária pode ser classificada como fácil ou difícil. Uma transferência é considerada difícil quando há resistência à progressão do cateter carregado, implicando tração ou dilatação do colo do útero, e presença de sangue no cateter de transferência. Quando não se verificam estas situações e a transferência decorre fluidamente, é considerada fácil. Uma vez que a manipulação uterina durante a transferência tem efeitos adversos nos resultados clínicos devem evitar-se transferências difíceis (Ghanem *et al.*, 2016).

A deteção de suscetibilidade a uma transferência difícil poderá ser feita antes do dia da transferência embrionária propriamente dita, através de uma transferência teste. Esta permite ao ginecologista avaliar o comprimento da cavidade uterina, a sua orientação e a facilidade de introdução do cateter através do canal endocervical, reduzindo o risco de uma posterior transferência embrionária difícil (Sueldo *et al.*, 2015) e aumentando as taxas de implantação e de gravidez (Sharif and Serour, 2019).

- **Remoção do muco cervical**

A presença de muco cervical no útero, em particular, poderá interferir com a transferência embrionária provocando o bloqueio do cateter, impedindo a liberação do embrião no útero, movimentando os embriões do seu local de implantação preferencial ou contaminando o ambiente uterino com microrganismos cervicais. Desta forma há indicações para que seja realizada a remoção do muco cervical, no momento da transferência, com impacto positivo nas taxas de gravidez e de nascidos vivos (Penzias *et al.*, 2017a).

- **Traumatismo endometrial**

Embora se defenda que o traumatismo do endométrio possa ter implicações negativas no sucesso da transferência, alguns estudos suportam a técnica de *scratching* do endométrio. Consiste num traumatismo intencional do endométrio, através de um procedimento simples como a biópsia endometrial, que desencadeará uma resposta inflamatória, com liberação de citocinas e fatores de crescimento, podendo ser vantajosa na implantação do embrião. Este procedimento é oferecido frequentemente a mulheres com histórico de falha de implantação (Vitagliano *et al.*, 2018). Esta técnica não é consensual, havendo estudos que demonstram não apresentar diferença significativa ou vantagem nas taxas de implantação, gravidez e gravidez de curso (Yeung *et al.*, 2014; Santamaria *et al.*, 2016; Levin *et al.*, 2017).

- **Cateter de transferência**

O tipo de cateter de transferência utilizado também tem influência no sucesso do procedimento: os cateteres flexíveis e maleáveis são atualmente preferidos aos cateteres rígidos (Penzias *et al.*, 2017a). Os primeiros permitem contornar as rugosidades da cavidade uterina havendo menor risco de dano no endométrio e menor risco de contaminação do cateter com sangue, muco ou tecido endometrial. Devido à sua maleabilidade podem tornar-se difíceis de inserir no útero, sendo necessário um obturador maleável para fixar a posição na cavidade uterina antes do carregamento do cateter flexível de transferência, facilitando a sua introdução (Schoolcraft, 2016). O recurso a este tipo de cateter está associado a taxas de gravidez mais elevadas que em transferências realizadas com cateteres rígidos (Penzias *et al.*, 2017a; Sigalos *et al.*, 2017). Aparentemente, não há um cateter de transferência embrionária específico (de

uma marca em particular) que apresente vantagens claras, devendo ter-se em conta o custo e a preferência pessoal de cada técnico (Penzias *et al.*, 2017a).

Um dos métodos mais comuns de carregamento do embrião no cateter é o “meio de transferência – ar – meio de transferência com embrião – ar – meio de transferência” (**Figura 9**). Este método terá a vantagem de, devido à existência de bolhas de ar no momento de transferência, permitir a identificação do posicionamento dos embriões no controlo ecográfico; o ar será ainda útil na proteção do embrião contra choques antes de ser inserido na cavidade uterina, protegendo-o nomeadamente de retenção no muco cervical, ao mesmo tempo que evita a adesão dos embriões ao cateter de transferência (Christianson *et al.*, 2014; Sigalos *et al.*, 2017). Por outro lado, a injeção de ar na cavidade uterina, ainda que num volume reduzido, poderá ter influência negativa na taxa de implantação. Este método apresenta ainda assim a maior prevalência, da ordem dos 42% em relação a métodos de carregamento alternativos (Christianson *et al.*, 2014). Métodos alternativos incluem o carregamento de um volume único de meio de transferência, com o embrião carregado na extremidade do cateter para assegurar a sua expulsão ou o carregamento do embrião num volume de meio de transferência entre volumes de ar, que assegurará que os embriões se mantêm intactos até ao momento da transferência para o útero. Em qualquer dos casos é de evitar a formação de bolhas de ar no volume de meio que contem o embrião (Sigalos *et al.*, 2017).

É importante ainda considerar o volume carregado no cateter de transferência – volumes demasiado reduzidos, abaixo dos 10µl, podem interferir com o sucesso da implantação enquanto volumes excessivos, acima dos 60µl, poderão causar expulsão do embrião do útero e retenção do embrião no cateter de transferência e aumentar o risco de gravidez ectópica (Mariani and Bellver, 2017; Sigalos *et al.*, 2017).

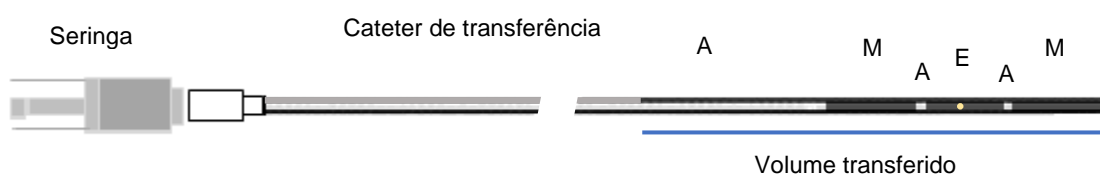


Figura 9. Esquema representativo do carregamento do cateter de transferência pelo método meio de transferência – ar – meio de transferência com embrião – ar – meio de transferência, com a indicação dos volumes relativos recomendados de cada porção. Legenda: **M** – meio de transferência; **A** – ar; **E** – meio de transferência com embrião. Adaptado (Cutting, 2019).

A velocidade de expulsão do embrião do cateter também tem influência no sucesso da implantação. Quando a velocidade de expulsão embrionária é mais lenta e controlada aumenta a probabilidade de o embrião atingir o fundo uterino, enquanto a expulsão rápida aumenta a chance de deslocalização do embrião do útero e o risco de lise celular (Sigalos *et al.*, 2017).

Outro fator considerado importante no procedimento da transferência é o intervalo de tempo entre o carregamento do cateter e a transferência do embrião para o útero. Segundo alguns guias clínicos este intervalo de tempo deve ser minimizado, tendo impacto nos resultados clínicos do ciclo (Schoolcraft, 2016; Mariani and Bellver, 2017). No entanto resultados de estudos recentes sugerem que intervalos de tempo mais longos não têm um efeito negativo na taxa de implantação, gravidez e de nados-vivos (Nouri *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018).

- **Controlo ecográfico da transferência embrionária**

O local onde o embrião é posicionado na cavidade uterina é importante, não havendo consenso sobre este tema. Há indícios de que o posicionamento da extremidade do cateter na região superior ou central da cavidade uterina, a mais de 1cm do fundo, está relacionado com maiores taxas de gravidez (Penzias *et al.*, 2017a). O local onde o embrião é libertado não é, contudo, determinante do seu local de implantação. O embrião poderá migrar na cavidade uterina, implantando noutro local; a contração endometrial, por exemplo, está associada a implantação na porção inferior da cavidade uterina (Saravels *et al.*, 2016).

A realização da transferência com controlo ecográfico (**Figura 10**) foi introduzida com o objetivo de diminuir a probabilidade de traumatismo do endométrio com o cateter de transferência, em comparação com a inserção do cateter sem visualização ou controlada pelo ginecologista através do toque (Penzias *et al.*, 2017a). O controlo ecográfico transabdominal é importante no diagnóstico de transferências difíceis, na confirmação do posicionamento do cateter, na minimização da contaminação do cateter com sangue ou muco e na diminuição da probabilidade de traumatismo do fundo uterino e de estimulação de contrações uterinas (Schoolcraft, 2016). Esta técnica reflete-se, a par do controlo ecográfico transvaginal, numa maior taxa de gravidez clínica e numa maior taxa de nados vivos (Penzias *et al.*, 2017a; Cozzolino *et al.*, 2018).

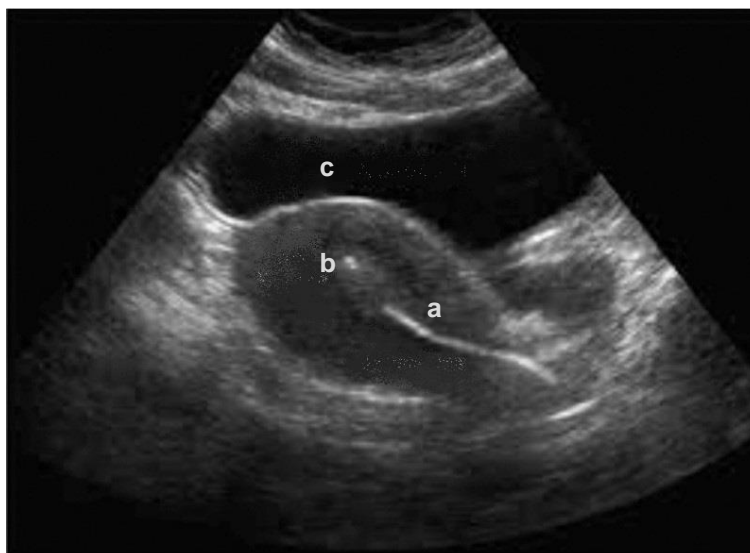


Figura 10. Ecografia transabdominal com o cateter de transferência embrionária (a) inserido na cavidade uterina e de bolhas de ar (b) no fundo do útero. A bexiga cheia (c) é requisito para a realização da ecografia transabdominal. Adaptado (Singh *et al.*, 2017).

- **Suplementação do meio de transferência embrionária**

O meio de transferência embrionária pode ser suplementado com substâncias como o ácido hialurónico (AH) ou outros fatores de crescimento, que podem ser benéficos para o processo de implantação. A suplementação do meio de transferência com AH terá por base teórica a presença de recetores para esta molécula no embrião antes da implantação e no endométrio no período peri-implantatário, podendo inferir-se o seu papel na implantação (Sigalos *et al.*, 2017). O recurso a este tipo de meio de transferência para aumentar a probabilidade de implantação é, contudo, controverso (Fancsovits *et al.*, 2015; Chun *et al.*, 2016); um estudo recente, em particular, reconhece a sua utilidade em caso de falha recorrente de implantação, desaconselhando o seu uso nas primeiras transferências (Fu *et al.*, 2018).

- **Remoção do cateter de transferência**

A remoção do cateter após a transferência do embrião deve ser realizada lentamente, mantendo a pressão na seringa até à remoção do cateter da cavidade uterina, evitando a reaspiração dos embriões (Mariani and Bellver, 2017). Uma vez retirado o cateter, o embriologista é responsável pela sua revisão para garantir que o embrião não ficou retido e terá sido depositado na cavidade uterina. Na eventualidade de o embrião ter ficado retido este deve ser recarregado no cateter e transferido. A

repetição do carregamento e da transferência não afetam a taxa de implantação, gravidez clínica ou abortamento (Penzias *et al.*, 2017a).

- **Contrações uterinas**

Frequentemente a dificuldade na transferência provoca traumatismos no endométrio; a presença de sangue no cateter de transferência após a injeção poderá ser sinal de sangramento do endométrio ou do colo uterino, que poderá afetar a implantação. A existência de sangue ou muco no cateter estão relacionadas com um maior risco de falhas na transferência e menor taxa de gravidez (Schoolcraft, 2016) mas parece não haver implicação na taxa de nados vivos (numa transferência fácil) (Plowden *et al.*, 2017)

Em virtude do efeito nefasto das contrações uterinas nas taxas de implantação e gravidez clínica, deve fazer-se um esforço para as reduzir no momento da transferência uterina e no período que a sucede. Para além da manipulação gentil durante a transferência poderá recorrer-se a medicação supressora de contrações uterinas, como é o caso do Atosiban ou, mais recentemente, do Nolasiban. Estes medicamentos atuam seletivamente no útero, como antagonistas nos recetores de oxitocina e vasopressina, para diminuir a amplitude e frequência das contrações uterinas demonstrando, no caso do Atosiban, efeito positivo na perfusão endometriometrial (Huang *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2018) e na recetividade do endométrio (Kalmantis *et al.*, 2012) promovendo a implantação e impedindo a expulsão precoce do embrião (Mariani and Bellver, 2017).

O Atosiban começou por ser aplicado na prevenção de partos prematuros mas mostrou-se útil em ciclos de PMA, com efeitos positivos nas taxas de implantação, de gravidez clínica (Huang *et al.*, 2017; Mishra *et al.*, 2018) e de nados-vivos, sobretudo em mulheres com falha de implantação recorrente (Huang *et al.*, 2017). O Nolasiban, tendo surgido mais recentemente, carece ainda de mais estudos, mas resultados recentes demonstram grande potencial deste fármaco em ciclos de PMA (Tournaye *et al.*, 2017; Visnova *et al.*, 2018; ObsEva, 2019).

A administração de progesterona no início do ciclo de PMA poderá ser vantajosa, sendo efetiva na diminuição da frequência das contrações uterinas e tornando-se benéfica para o sucesso do ciclo devido ao relaxamento endometriometrial antes da transferência embrionária (Fanchin *et al.*, 2001; Mariani and Bellver, 2017).

- **Período de repouso após transferência embrionária**

Inicialmente havia recomendação para um período de repouso absoluto, de entre 10 a 30 minutos, após a transferência, de modo a evitar a contração do útero e a expulsão do embrião (Penzias *et al.*, 2017a). Atualmente este período de repouso não é mandatório, não sendo considerada vantajoso para as taxas de gravidez e de nados-vivos, podendo períodos de repouso extensos diminuir a taxa de implantação (Craciunas and Tsampras, 2016; Penzias *et al.*, 2017a).

3.4 Aspetos a considerar após a transferência

A obtenção de gravidez num caso normal depende do desenvolvimento endometrial adequado que é assegurado pelos níveis regulados de estrogénios e progesterona. Em ciclos de tratamento de infertilidade, durante a fase lútea os níveis hormonais são alterados, podendo não ser suficientes para induzir a maturação necessária para o sucesso da implantação e para suportar uma gravidez (Harrity *et al.*, 2015; Yanushpolsky, 2015). Desta forma, após a transferência e para assegurar melhores condições endometriais, é realizado o suporte hormonal da fase lútea – a suplementação com progesterona é a mais comumente utilizada, permitindo melhores resultados na gravidez e maior taxa de nados vivos. A progesterona é administrada após administração exógena de estrogénios, e vai promover o aumento da densidade do estroma uterino, a vasodilatação e o aumento das secreções, tornando o endométrio recetivo à implantação do blastocisto (Harrity *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018b).

Outro método de suporte da fase lútea é a suplementação com hCG, que é limitada por potenciar o risco de SHO⁴ (Síndrome de Hiperestimulação Ovária) (Harrity *et al.*, 2015).

A transferência embrionária é um procedimento bastante exigente. Apesar da falta de consenso em relação a alguns aspetos, a sua otimização assegura melhores resultados para os ciclos de tratamento de infertilidade, que são o objetivo principal do esforço desenvolvido num centro de PMA.

⁴ SHO é uma complicação que pode ser inadvertidamente induzida pela estimulação ovária, surgindo cerca de 9 dias após a estimulação hormonal com gonadotrofinas exógenas seguidas da administração de hCG (Jahromi *et al.*, 2018).

4. Criopreservação

A criopreservação de gâmetas e embriões é essencial em procriação medicamente assistida uma vez que aumenta a eficácia e segurança dos ciclos de estimulação ovárica e permite a preservação de fertilidade.

Os dois principais métodos de criopreservação são a congelação lenta e a vitrificação. Em ambos os casos o maior desafio é prevenir a formação de cristais de gelo e a toxicidade induzida por crioprotetores, que são as principais causas de inviabilização celular durante a criopreservação (Konc *et al.*, 2014).

Os crioprotetores são substâncias adicionadas à solução de congelação que substituem o conteúdo hídrico da célula, auxiliando na desidratação celular, e que não congelam quando arrefecidas rapidamente até temperaturas muito baixas evitando a formação de cristais de gelo (Konc *et al.*, 2014; Liebermann, 2017). Há crioprotetores permeáveis da membrana celular (como o propilenoglicol, o DMSO, o glicerol ou o etilenoglicol) e não permeáveis (como a sacarose, glucose, trealose, proteínas ou lipoproteínas). Os primeiros expulsam a água do interior da célula através de um gradiente osmótico, ocupando o seu lugar enquanto os últimos aumentam a osmolaridade no exterior da célula gerando um gradiente osmótico que conduz à desidratação da célula. Estes mantêm ainda um equilíbrio impedindo a rápida entrada de água na célula após a descongelação (Konc *et al.*, 2014).

A congelação lenta requer a exposição das células (embriões ou oócitos) a uma baixa concentração de crioprotetores para que ocorra a sua desidratação. As palhetas de congelação, contendo as células, são depois sujeitas a uma redução lenta da temperatura até aos -30°C (Edgar and Gook, 2012). Durante o arrefecimento lento é induzida a nucleação dos cristais de gelo, processo designado de *seeding* que consiste no crescimento lento do cristal, a uma temperatura de -5°C a -8°C. Atingida a temperatura de -30°C é feita uma redução rápida até aos -150°C. O procedimento termina com o armazenamento das palhetas em azoto líquido (-196°C) (Edgar and Gook, 2012). No momento do descongelamento, para evitar a recristalização do gelo, que é uma das principais causas de dano celular, a amostra tem de ser aquecida rapidamente a uma temperatura entre os 25°C e os 37°C (Son and Tan, 2009; Konc *et al.*, 2014). Este método de criopreservação permite o arrefecimento a uma velocidade lenta o suficiente para permitir a desidratação adequada das células enquanto a formação de cristais de gelo é minimizada (Rienzi *et al.*, 2017).

A vitrificação é um método de criopreservação que provoca a solidificação das células, até um estado vítreo, e do meio extracelular sem a formação de cristais de gelo,

que causam danos na célula podendo inviabilizá-la (Jang *et al.*, 2017). O segredo da vitrificação reside na maior concentração de soluções crioprotetoras, no arrefecimento e aquecimento ultrarrápido e nos reduzidos volumes que são utilizados (Konc *et al.*, 2014; Rienzi *et al.*, 2017). O procedimento de vitrificação será mais simples: as células são expostas a soluções crioprotetoras, carregadas em palhetas de criopreservação e mergulhadas em azoto líquido para que o abaixamento de temperatura seja ultrarrápido. O sucesso do procedimento de vitrificação é assim sobretudo dependente do protocolo e do *kit* de vitrificação utilizado e da capacidade técnica do embriologista (Rienzi *et al.*, 2017).

Uma desvantagem desta técnica é a elevada concentração de solução crioprotetora a que os embriões ou oócitos são sujeitos, que poderá tornar-se tóxica para as células (Liebermann, 2017).

Atualmente, o método de vitrificação é considerado superior e mais seguro que a congelação lenta para a criopreservação de oócitos e embriões (em qualquer fase de desenvolvimento). O desenvolvimento da técnica de vitrificação permitiu, em comparação com outras técnicas de criopreservação, um aumento nas taxas de sobrevivência de oócitos e embriões após desvitrificação e uma melhoria nos resultados clínicos, incluindo um aumento nas taxas de gravidez e de nados-vivos após transferência de blastocistos criopreservados. Há dados que sugerem que a transição do procedimento de congelação lenta para a vitrificação num laboratório fará aumentar as taxas de sobrevivência à criopreservação de 60% para 78 a 100% (Rienzi *et al.*, 2017).

Relativamente às taxas de sobrevivência de embriões e blastocistos após desvitrificação, os resultados são satisfatórios para os diferentes *kits* de criopreservação utilizados atualmente por diferentes marcas (**Tabela 2**).

Tabela 2. Taxas de sobrevivência de embriões e blastocistos após desvitrificação obtidas com diferentes *kits* de vitrificação disponíveis atualmente no mercado.

Meio de vitrificação	% de sobrevivência de embriões em clivagem	% de sobrevivência de blastocistos
Kitazato™ (KITAZATO, 2019)	> 90	> 90
ORIGIO™ (CooperSurgical, 2018)	92	94
SAGE™ (CooperSurgical, 2018)	97	96
Rapid-i Vitrification System™ (Desai <i>et al.</i> , 2013)	92	97

O avanço brutal registado nas técnicas de criopreservação teve impacto na preservação de fertilidade, na possibilidade de recurso a bancos de dadores (Rienzi *et al.*, 2017) e em ciclos de tratamento de infertilidade com embriões excedentes ou em que é necessário o adiamento da transferência, uma vez que permite a segura preservação das células.

5. Transferência de embriões criopreservados

A disseminação da política de transferência de um único embrião, a melhoria das técnicas de seleção embrionária e das condições de cultura até ao 5º dia fazem com que mais embriões sejam selecionados e passíveis de transferir, evidenciando a importância da criopreservação e dos bons resultados associados à transferência de embriões criopreservados (Rienzi *et al.*, 2017).

A criopreservação pode ser útil ainda em caso de risco de SHO. A criopreservação dos embriões durante o ciclo a fresco e transferência após descongelação num ciclo mais tardio é segura, apresenta bons resultados e evita os efeitos adversos graves da SHO (Shin *et al.*, 2018; Zech *et al.*, 2018).

O sucesso da transferência de embriões criopreservados permitiu o crescimento de protocolos de segmentação do ciclo de tratamento de fertilidade. Em ciclos naturais, a estimulação ovárica a que a mulher é sujeita aumenta o estrogénio e a progesterona para níveis suprafisiológicos o que interfere com o desenvolvimento endometrial (Maheshwari *et al.*, 2016). Por esse motivo o ambiente uterino de um ciclo estimulado não será síncrono com o estágio de desenvolvimento dos embriões obtidos nesse ciclo. A segmentação do ciclo requer a realização da estimulação hormonal, numa primeira fase, para a recuperação de oócitos, a sua inseminação e o acompanhamento do desenvolvimento embrionário e a criopreservação de todos os embriões de qualidade satisfatória – *freeze-all*. Numa fase posterior é realizada a transferência de embriões criopreservados e desvitrificados, não sendo realizada transferência de embriões a fresco (Wong *et al.*, 2017).

A transferência de embriões posteriormente requer a preparação endometrial, assegurando que este se encontra nas melhores condições para acolher o embrião. A transferência dos embriões pode ser realizada em ciclos naturais – este método implica a identificação da janela de implantação, que acontece pouco após a ovulação. A ovulação pode ser indiciada pela deteção do pico de LH, num ciclo natural verdadeiro, ou pode ser provocada pela administração de hCG, num ciclo natural modificado. Em ambos os métodos, é acompanhado o desenvolvimento do folículo dominante através

de constantes avaliações ecográficas e, no caso do ciclo natural modificado, quando este atinge um determinado tamanho é administrada a hCG e agendada a transferência. Num ciclo natural verdadeiro, apesar da monitorização a ovulação pode ocorrer espontaneamente; não sendo possível determinar o momento em que esta ocorreu, de modo a agendar a transferência, esta poderá ser cancelada (Groenewoud *et al.*, 2012). O ciclo natural será vantajoso em mulheres com ciclos menstruais regulares, implicando menos medicação e um menor custo para a paciente, embora exija um maior número de visitas ao centro de PMA para monitorização dos níveis de LH, do folículo dominante e do desenvolvimento endometrial (Agha-Hosseini *et al.*, 2018). A dificuldade na deteção do pico de LH faz com que o ciclo natural verdadeiro esteja associado a maiores taxas de cancelamento de transferência (Kang, 2018).

Para responder a estes problemas foi sendo desenvolvido o ciclo artificial, um método de preparação endometrial que recorre à administração de hormonas para mimetizar o ciclo hormonal regular; este método pode ser realizado com ou sem a administração de agonista de GnRH (hormona libertadora de gonadotrofinas, do inglês *gonadotropin-releasing hormone*) para impedir a ovulação espontânea. A paciente é sujeita a administração de estrogénio para promover a proliferação celular no endométrio e evitar a formação do folículo dominante, impedindo a ovulação prematura e a luteinização que tornariam o endométrio recetivo prematuramente. Quando a espessura endometrial é satisfatória inicia-se a administração de progesterona, que atua sobre as células do endométrio previamente preparadas pelo estrogénio, mimetizando a transição para a fase secretora do ciclo uterino. O agendamento da transferência é, desta forma, plenamente controlado podendo ser agendado quando conveniente para a paciente e/ou para o corpo clínico (Groenewoud *et al.*, 2012).

A transferência de embriões criopreservados apresenta resultados favoráveis, havendo evidências de maiores taxas de implantação e de gravidez (Wang *et al.*, 2017), maiores taxas de nados-vivos (Stanhiser *et al.*, 2017) e de melhores resultados perinatais (peso e tamanho do recém nascido) que em transferências de embriões a fresco (Zhang *et al.*, 2018a).

Todavia alguns trabalhos sugerem que a transferência de embriões criopreservados poderá não ser a melhor opção em todos os casos. Aparentemente mulheres de idade avançada e boas respondedoras (no trabalho em questão consideradas como mulheres que obtiveram mais de 15 óócitos na punção folicular) poderão beneficiar particularmente da realização de uma TEC (Wang *et al.*, 2017; Roque *et al.*, 2018).

Não existe atualmente um consenso em relação à superioridade de um dos métodos de transferência, persistindo dúvidas relativamente aos critérios de seleção do momento em que o embrião deva ser transferido.

Capítulo II

Objetivos

Face às dúvidas que subsistem sobre que tipo de transferência (TEF ou TEC) deve ser preferido e em que casos particulares devem ser aplicados surge o interesse na comparação de ambos.

O objetivo do trabalho desenvolvido ao longo do ano letivo no Laboratório da Unidade de Medicina de Reprodução (UMR) do Hospital de São João foi determinar se há diferenças significativas entre TEF e TEC com a variação da idade da mulher, o número de oócitos recuperados na punção folicular, a taxa de fecundação e a qualidade embrionária e a espessura endometrial, permitindo assim inferir se estes fatores podem ser utilizados para selecionar o momento da transferência. Os resultados clínicos avaliados nesta comparação foram a gravidez bioquímica, a gravidez clínica, o parto e o abortamento. Apesar do objetivo final de um ciclo de PMA ser a obtenção de um nado vivo a informação relativa à ocorrência de parto é limitada pelo que foi dada especial atenção à gravidez clínica (Clarke *et al.*, 2010). De modo a perceber como a transferência de embriões criopreservados pode ser otimizada foi estudada ainda a interferência da estimulação hormonal no sucesso da TEC.

Um objetivo paralelo foi o de adquirir experiência nas técnicas laboratoriais desenvolvidas num laboratório de procriação medicamente assistida quer pela observação quer pela prática orientada de determinados procedimentos.

Capítulo III

Material e Métodos

1. Critérios de elegibilidade

Para responder ao objetivo proposto foi feito um estudo retrospectivo sobre a população que se deslocou à UMR do Hospital de São João para tratamentos de infertilidade entre janeiro de 2011 e dezembro de 2018. Foram selecionados para análise casos em que o mesmo casal tenha realizado transferência de embriões durante o ciclo de tratamento de PMA (transferência a fresco) e criopreservação de embriões supranumerários e, posteriormente, transferência desses embriões criopreservados. Incluem-se nos critérios de elegibilidade casos em que a mulher tenha entre 20 e 40 anos de idade e que tenham realizado ciclos de fertilização *in vitro* (FIV convencional ou ICSI) para tratamento de um fator de infertilidade masculino, feminino (ovulatório ou tubar) ou desconhecido. No caso de o mesmo casal ter realizado mais que uma TEC este será representado tantas vezes quanto o número de transferências de embriões criopreservados.

Não cumpriram os critérios de elegibilidade casais que tenham recorrido à UMR para um ciclo de DGPI, uma vez que estes casais não o fazem por existência de um fator de infertilidade, condicionando assim a análise. Mulheres com fator uterino de infertilidade ou com anomalias uterinas, como pólipos, adesões uterinas ou miomas foram também excluídas da análise uma vez que estes defeitos na cavidade uterina podem limitar a implantação (Goldberg *et al.*, 2018), interferindo com o resultado clínico do ciclo. Casos clínicos com registo de útero bicórneo não foram inseridos na análise, uma vez que esta condição está associada a abortamentos de repetição (Parmar and Tomar, 2014). Não se inseriram nos critérios de elegibilidade ciclos em que tenham sido transferidos embriões a fresco juntamente com embriões criopreservados (uma vez que não é possível determinar qual dos embriões terá implantado) e ciclos em que tenham sido transferidos, em TE e TEC, embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, que não seriam comparáveis. Não foram incluídos na análise dados de ciclos que, apesar de cumprirem os critérios de elegibilidade, se encontravam em arquivo definitivo.

2. Análise estatística

Os dados incluídos nesta análise foram colecionados através da pesquisa em processos clínicos constantes do Arquivo Geral da UMR do CHUSJ. Os dados relevantes para o trabalho foram organizados numa base de dados para posterior análise estatística.

A análise estatística foi realizada no SPSS v.23.

O nível de significância estatística definido foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Valores de significância até 10% ($\alpha < 0,10$) foram definidos como marginalmente significativos.

A análise exploratória de dados incidiu sobre a frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas, e sobre média (M), desvio-padrão (DP), valores mínimo (Mín) e máximo (Máx) para as variáveis quantitativas. A dispersão foi ainda verificada pelo coeficiente de variação (CV).

A comparação entre dois momentos na mesma amostra (TEF vs TEC), numa variável nominal dicotómica (como são a gravidez bioquímica, gravidez clínica, gravidez ectópica, abortamento e parto), foi realizada pelo teste de McNemar.

A comparação entre dois grupos independentes (por exemplo “com gravidez” vs “sem gravidez”) quanto às variáveis quantitativas “idade da mulher”, “número de oócitos recuperados”, “taxa de fecundação” e “espessura endometrial”, foi realizada pelo teste *t* de medidas independentes.

A avaliação da existência de diferenças entre grupos relativamente à média das variáveis dependentes foi realizada segundo o teste ANOVA de um fator.

A verificação da existência de relações de independência entre duas variáveis qualitativas, como é o caso da “qualidade embrionária” com a “gravidez bioquímica”/“gravidez clínica” ou da “preparação endometrial” com as mesmas variáveis dependentes, foi efetuada pelo teste de independência do quiquadrado de Pearson (χ^2). Na impossibilidade do cumprimento dos pressupostos para a realização deste teste, recorreu-se à estatística *likelihood ratio* (LR).

Para a análise de algumas variáveis foi necessária a estratificação. A variável “qualidade embrionária” foi dividida em três classes (**Tabela 5**): classe 1 – embriões de qualidade superior incluindo casos em que foram transferidos embriões A, B ou A e B; classe 2 – embriões de qualidade intermédia incluindo casos em que foram transferidos embriões A ou B junto de embriões C; classe 3 – embriões de pior qualidade incluindo casos em que foram transferidos apenas embriões C ou embriões D, ainda que como acompanhamento de embriões A ou B (*Material e Métodos - 3.5. Avaliação da fecundação e do desenvolvimento embrionário*).

As variáveis dependentes, usadas como medida do sucesso do ciclo, são a “gravidez bioquímica”, a “gravidez clínica”, o “parto”, o “abortamento” e a “gravidez ectópica”. Estas variáveis são do tipo nominal dicotómico, tendo sido atribuído o valor “0” no caso de não ocorrência e o valor “1” no caso de ocorrência.

Neste trabalho, define-se “taxa de gravidez bioquímica” como o número de casos com valor de β hCG positivo sobre o total de transferências embrionárias realizadas e a

“taxa de gravidez clínica” como o número de casos em que foi detetado pelo menos um saco gestacional intrauterino (com registo de atividade cardíaca fetal) sobre o total de transferências embrionárias realizadas.

3. Trabalho laboratorial

O material utilizado durante o período de estágio foi cedido pelo laboratório da Unidade de Medicina de Reprodução do Hospital de S. João.

Os procedimentos foram realizados, sempre que necessário, em câmaras de fluxo laminar e ambiente assético com material não tóxico adequado à manipulação de material biológico, nomeadamente gâmetas e embriões.

As incubadoras de cultura embrionária são mantidas à temperatura de 37°C, a 6% de CO₂ e 5% de O₂.

As placas de cultura são preparadas com meio de cultura apropriado ao estágio de desenvolvimento e cobertas com óleo mineral, exceto no caso das placas de transferência embrionária, a que não é adicionado óleo mineral. Esta preparação é realizada na véspera de utilização de modo a assegurar o tempo de incubação necessário para equilíbrio térmico e gasoso dos meios de cultura. Os meios de cultura utilizados são meios sequenciais, formulados no sentido de mimetizar o ambiente *in vivo*.

3.1 Protocolo de estimulação hormonal

A estimulação hormonal requer a supressão hipofisária com antagonista da GnRH ou com agonista da GnRH num protocolo longo e a estimulação ovárica com FSH recombinante. Durante o processo de estimulação é realizada a monitorização do desenvolvimento folicular e quando os folículos em desenvolvimento atingem um determinado tamanho é dada a indicação para interrupção da estimulação ovárica e da administração de antagonista de GnRH e é administrada hCG.

A punção folicular é realizada 36 horas após a administração de hCG. Após a punção folicular é iniciada a administração de progesterona para suporte da fase lútea, sendo mantida, em caso de gravidez, até à 10^a semana de gestação.

Para a transferência de embriões criopreservados em ciclo natural modificado, o desenvolvimento do folículo dominante é acompanhado ecograficamente e a indução da ovulação é realizada com hCG. No caso da transferência de embriões

criopreservados em ciclo artificial, a estimulação hormonal é iniciada com supressão hipofisária com agonista de GnRH seguindo-se a estimulação hormonal com estradiol. É realizada a monitorização ecográfica do endométrio para avaliação da sua espessura e assim que esta atinge valores superiores a 8mm é iniciada a administração de progesterona e mantida a administração de estradiol. Esta combinação é mantida, em caso de gravidez, até às 10 semanas.

3.2 Punção folicular e manipulação de gâmetas femininos

A punção folicular é o procedimento que dá início ao ciclo de tratamento de PMA após estimulação hormonal ovárica controlada e orientada pela equipa médica e de enfermagem. Este procedimento é realizado por um ginecologista e um enfermeiro que realizam a aspiração de líquido folicular através de uma agulha transvaginal ecoguiada, sendo todo o processo acompanhado ultrassonograficamente. No momento da punção folicular o ginecologista realiza a medição da espessura endometrial.

Durante o procedimento a paciente encontra-se sob anestesia geral. O líquido folicular é aspirado para seringas contendo meio de lavagem à temperatura de 37°C. Após a aspiração do líquido folicular, o conteúdo das seringas é observado à lupa por embriologistas de modo a localizar e isolar complexos CCO, que são no momento manipulados mecanicamente de modo a remover o máximo de células do *cumulus* possível, sendo de seguida transferidos para um meio de cultura adaptado à cultura de oócitos e à sua fertilização *in vitro* e mantidos em incubação a 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂ até posterior manipulação.

3.3 Manipulação de gâmetas masculinos – capacitação espermática

A colheita de sémen é realizada pelo elemento masculino do casal na Unidade de Medicina de Reprodução ou, nos casos em que se justifica, no domicílio através de ejaculação após um período de abstinência sexual de 1 a 3 dias. Após um período de incubação de aproximadamente meia hora, para liquefação da amostra, são avaliados os parâmetros macroscópicos (volume, cor, cheiro, viscosidade) e microscópicos (concentração, motilidade, presença de outras células, aglutinação ou agregação).

As amostras são sujeitas a centrifugação em gradientes de densidade (55 e 80%) para concentração e separação dos espermatozoides do líquido seminal e, sempre que possível, a *swim-up* – um processo que consiste na ascensão de espermatozoides com

melhor motilidade à superfície do volume de meio de lavagem de espermatozoides colocado num tubo. No final é realizada a análise da capacitação espermática.

No caso de o tratamento ser realizado com recurso a uma amostra de espermatozoides criopreservada, esta é descongelada à temperatura ambiente. É realizada a lavagem da amostra e, sempre que possível, o *swim-up* e é depois avaliada a capacitação espermática.

Deste processamento resultam espermatozoides capacitados que poderão ser depois utilizados nas diferentes técnicas de fertilização.

3.4 Fertilização *in vitro*

3.4.1 FIV convencional

Aproximadamente 4 a 5 horas após a punção folicular o ócito estará pronto a ser inseminado. Ao meio de cultura onde se encontram os ócitos é adicionado o volume de espermatozoides correspondente a 100 000 espermatozoides/ml. Após a inseminação observa-se a cocultura ao microscópio invertido de modo a verificar a adequada quantidade e motilidade dos espermatozoides. Os gâmetas são incubados a 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂ até posterior manipulação.

Cerca de 16 a 20 horas depois da inseminação é feita a desnudação dos complexos CCO com recurso a pipetas de desnudação para avaliação da fecundação.

3.4.2 Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides

Aproximadamente 3 horas depois da punção é realizada a desnudação dos complexos contendo o ócito. Estes são primeiro cuidadosamente manipulados numa solução enzimática (hialuronidase), de modo a remover as células que envolvem o ócito e, posteriormente, sujeitos a um processo mecânico com o auxílio de pipetas de desnudação de menor diâmetro.

Aproximadamente 4 horas após a punção folicular o ócito estará pronto a ser inseminado. Este procedimento é realizado num microscópio invertido onde é realizada a seleção dos espermatozoides, com base sobretudo na sua morfologia e motilidade, e a injeção dos ócitos com os espermatozoides selecionados.

Durante a injeção são anotados parâmetros relacionados com a qualidade oocitária e a injeção propriamente dita que poderão ser importantes para a qualificação embrionária (ASEBIR, 2015).

Os oócitos inseminados são posteriormente transferidos para um novo meio de cultura, adaptado à cultura de embriões em clivagem, e mantidos em incubação a 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂.

. Aproximadamente 16 a 20 horas depois da inseminação é feita a avaliação da fecundação.

3.5 Avaliação da fecundação e do desenvolvimento embrionário

A fecundação é avaliada no dia seguinte à inseminação dos oócitos pela sua observação no microscópio invertido, avaliando-se o número, tamanho e localização dos glóbulos polares, o número de pronúcleos e a sua aparência (simetria, sincronia e localização), o número, simetria e polarização dos precursores nucleolares, a presença/ausência do halo citoplasmático, outras características relevantes para a avaliação da qualidade do futuro embrião (presença de vacúolos ou retículo endoplasmático visíveis) e o ritmo de divisão (ASEBIR, 2015). Após a avaliação da fecundação os oócitos fecundados são transferidos para um meio de cultura adaptado à fase de desenvolvimento em que se encontram e incubados a 37°C, 6% CO₂ e 5% de O₂.

O desenvolvimento embrionário é acompanhado diariamente por observação dos embriões num microscópio invertido e anotação das características relevantes para a sua qualificação. Na UMR do HSJ são utilizados os parâmetros de qualificação da ASEBIR (Associação para o Estudo da Biologia da Reprodução), sendo, nos embriões em clivagem (nos dias 2 e 3 após inseminação), avaliados o número de células e ritmo de divisão, o grau de fragmentação celular, o tamanho, forma e grau de simetria das células (específico ou não do estágio de desenvolvimento), a presença de núcleo nas células e eventual multinucleação, a presença de anomalias citoplasmáticas e vacuolização, o aspeto da zona pelúcida e o grau de compactação celular. Nos embriões ao dia 4 após a fecundação é avaliada a divisão celular, a adesão celular e o grau de compactação das blastómeras e ainda a fragmentação e vacuolização existente. Nos blastocistos é avaliada a presença de blastocélio, o grau de expansão da zona pelúcida, o grau de compactação da massa celular interna e a homogeneidade da trofoectoderme (ASEBIR, 2015).

3.6 Transferência embrionária

Após a seleção do(s) embrião/ões de melhor qualidade, consoante a decisão informada do casal em relação ao número de embriões a transferir, este(s) é/são transferidos do meio de cultura para um meio de transferência.

O procedimento de transferência embrionária é realizado com guia ultrassonográfica por um ginecologista, responsável pela inserção vaginal da sonda. Após a indicação do ginecologista o embriologista faz o carregamento do cateter de transferência com o(s) embrião/ões selecionado(s) e o médico é depois responsável pela sua deposição na cavidade uterina.

O embriologista recebe o cateter após a transferência para realizar a confirmação da transferência embrionária, assegurando que os embriões não permaneceram retidos no cateter. Na eventualidade de tal acontecer, estes são recarregados no cateter e novamente transferidos.

Caso existam em cultura embriões excedentários em estado evolutivo estes poderão permanecer em cultura para observação do seu desenvolvimento ou ser vitrificados.

Nos casos incluídos no presente trabalho a transferência embrionária foi realizada com recurso ao mesmo tipo de cateter (COOK®).

3.7 Criopreservação de embriões

Os embriões excedentários com potencial de desenvolvimento satisfatório são criopreservados pelo método de vitrificação de acordo com o protocolo vigente no centro de PMA.

No caso da transferência de embriões criopreservados, os embriões são desvitrificados no dia da transferência ou na véspera de acordo com a qualidade embrionária e/ou o estágio de desenvolvimento, e mantidos em cultura até ao momento da transferência. No momento da transferência são carregados no cateter de transferência, pelo mesmo método acima descrito. São passíveis de transferência embriões que, após desvitrificação, se apresentem evolutivos e em que, existindo células degenerativas, estas estejam isoladas e não excedam 35% do volume do embrião.

4. Acompanhamento pós-transferência

A paciente regressa à UMR, preferencialmente, 12 dias após a transferência embrionária, para colheita sanguínea e doseamento de β hCG. A gravidez bioquímica é definida para valores séricos de β hCG $>1,2$ UI/dl. Quatro semanas após a transferência embrionária é realizada uma ecografia para confirmação da gravidez. A gravidez clínica é confirmada pela visualização de um saco gestacional intrauterino e deteção de atividade cardíaca fetal. Caso os valores de β hCG indiquem a inexistência de gravidez ou não haja confirmação ecográfica da gravidez o casal é de novo reencaminhado para consulta médica para discussão do caso clínico. Se durante a ecografia o embrião for localizado fora da cavidade uterina é definida uma gravidez ectópica. Neste trabalho em particular definiu-se como abortamento a falha na evolução da gravidez em qualquer momento (falha na evolução de gravidez bioquímica ou clínica).

Confirmada a gravidez na ecografia o casal é reencaminhado para uma Unidade de Obstetrícia ao seu critério, deixando de ser acompanhado pela equipa de Medicina da Reprodução. É pedido ao casal que, no termo da gravidez e após o parto, envie para a UMR um relatório que lhes é fornecido no final do ciclo com dados relativos ao parto e ao recém-nascido.

Capítulo IV

Resultados

1. Análise descritiva da população

O presente estudo conta com 179 casos clínicos de casais que realizaram transferência de embriões a fresco e transferência de embriões criopreservados.

Na **Tabela 3** encontra-se uma descrição das variáveis independentes utilizadas neste estudo.

Tabela 3. Caracterização da população total: valores mínimo (Mín) e máximo (Máx), média (M), desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV) das variáveis independentes.

Variáveis independentes	Min	Máx	M	DP	CV
Idade (TE)	23	39	33,2	3,50	10,5
Idade (TEC)	24	42	33,84	3,62	10,7
Nº de oócitos recuperados	3	35	13,57	5,81	42,8
% de fecundação	33,3	100	78,3	14,74	18,8
Espessura do endométrio (TE)	4,1	15,0	10,02	2,10	21,0
Espessura do endométrio (TEC)	5	14	8,54	1,51	17,7

2. Sucesso dos ciclos com TEF vs ciclos com TEC

Inicialmente, realizou-se uma análise para averiguar se existiam diferenças significativas no sucesso dos ciclos com a realização de transferência de embriões a fresco (TEF) e a realização de transferência de embriões criopreservados (TEC). Para tal realizou-se o teste de McNemar. A estatística deste teste é calculada com base nos grupos discordantes, isto é, os grupos cuja situação se alterou entre os dois momentos de avaliação. A análise foi feita, portanto sobre dois grupos constituídos especificamente para este teste: Grupo 1 (indivíduos com ocorrência de gravidez, parto ou abortamento na TEF e não ocorrência destes na TEC) e Grupo 2 (indivíduos em que não ocorreu gravidez, parto ou abortamento na TEF e estes ocorreram na TEC) (**Tabela 4**).

A ocorrência de gravidez bioquímica, gravidez clínica, gravidez ectópica e parto foi em geral maior para os ciclos com TEC. A taxa de abortamento foi superior nos ciclos com TEF (**Tabela 4**).

Registaram-se diferenças significativas entre TEF e TEC na ocorrência de gravidez bioquímica (35,4% vs 64,6%, $p < 0,05$), na ocorrência de gravidez clínica (28,3% vs 71,6%, $p < 0,05$) e na ocorrência de parto (14,3% vs 85,7%, $p < 0,05$) (**Tabela 4**).

De notar que para 29 dos casos com TEF e para 44 dos casos com TEC não foi possível determinar a ocorrência ou não de parto e/ou abortamento, em alguns casos por perda dos registos para *follow-up* noutros por serem ciclos recentes com possíveis

gravidezes ainda em curso. Deste modo os dados relativos a parto e abortamento não serão considerados nas análises posteriores.

A tabulação cruzada correspondente a esta análise encontra-se em Anexo (Anexo 1).

Tabela 4. Teste de McNemar para comparação do sucesso do ciclo após TEF e após TEC. O Grupo 1 designa casos em que houve ocorrência de gravidez/abortamento/parto após TEF e não ocorrência destes após TEC; o Grupo 2 designa casos em que não houve ocorrência de gravidez/abortamento/parto após TEF e houve ocorrência destes após TEC. * diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). (a) foi usada a distribuição binomial. (b) estatística do teste quiquadrado com correção de continuidade.

Ocorrência de sucesso	Grupo 1 – n (%)	Grupo 2 – n (%)	χ^2 (b)	p
Gravidez bioquímica	29 (35,4%)	53 (64,6%)	6,451	0,0111*
Gravidez clínica	17 (28,3%)	43 (71,6%)	10,417	0,0012*
Parto	2 (14,3%)	12 (85,7%)	(a)	0,0129*
Abortamento	21 (53,8%)	18 (46,2%)	0,1026	0,7493
Gravidez ectópica	1 (20%)	4 (80,0%)	(a)	0,3750

3. Influência das variáveis no sucesso dos ciclos

De modo a responder ao objetivo do trabalho, compreender que critérios poderão ser utilizados para a escolha do método de transferência, a população foi dividida em três grupos de acordo com a idade feminina: Grupo A com idades entre os 23 e os 29, o Grupo B com idades entre os 30 e os 34 e o Grupo C com idades dos 35 aos 40. Foi realizada a caracterização dos três grupos para as variáveis em estudo: número de oócitos recuperados, qualidade embrionária, taxa de fecundação, espessura endometrial e, no caso das TEC, da preparação endometrial. Posteriormente foi calculada a taxa de gravidez bioquímica e clínica associada a cada grupo. Os resultados estão descritos na **Tabela 5**. Verificam-se taxas de gravidez bioquímica e clínica superiores nos ciclos com TEC, embora os resultados só sejam significativamente superiores no grupo B ($p = 0,04$ e $p = 0,008$, respetivamente).

As diferenças entre os grupos relativamente às médias das variáveis independentes foram calculadas, não tendo sido registadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

A caracterização dos grupos definidos relativamente à técnica de inseminação utilizada e ao fator de infertilidade subjacente encontram-se em Anexo (**Anexo 2**).

Tabela 5. Definição e caracterização dos grupos A, B e C incluídos no estudo. Para as variáveis independentes são apresentados os valores médios (\bar{x}), a percentagem média (%) ou o número de casos (n) consoante a variável em causa.

(1) diferença estatisticamente significativa (p = 0,04). (2) diferença estatisticamente significativa (p = 0,008).

Variáveis		TEF			TEC		
		Grupo A [23; 29]	Grupo B [30;34]	Grupo C [35;40]	Grupo A [23; 29]	Grupo B [30;34]	Grupo C [35;40]
<i>n</i>		25	97	57	25	97	57
Nº oócitos recuperados (\bar{x})		13,40	13,78	13,28	13,40	13,78	13,28
Qualidade embrionária	A (n)	18	84	49	14	79	36
	B (n)	7	12	5	10	15	18
	C (n)	0	1	3	1	3	3
Taxa de fecundação (%)		83,71	76,83	78,55	83,71	76,83	78,55
Espessura endometrial (TEF) (\bar{x})		10,23	9,92	10,09	-	-	-
Espessura endometrial (TEC) (\bar{x})		-	-	-	8,64	8,51	8,55
Preparação endometrial	Natural (n)				14	55	40
	Artificial (n)	-	-	-	11	42	17
Taxa Gravidez bioquímica (%)		24,0	22,7¹	22,8	32,0	36,1¹	38,6
Taxa Gravidez clínica (%)		12,0	13,4²	14,0	24,0	28,9²	28,1
Taxa Gravidez ectópica (%)		4,0	0	0	4,0	2,1	1,8

3.1 A influência da idade feminina no sucesso do ciclo

No total da população inserida no estudo a média de idades das mulheres no momento da TEF é $33 \pm 3,5$ anos (Mín.= 23; Máx.= 39) e $34 \pm 3,6$ anos (Mín.= 24; Máx.= 42) no momento da TEC (**Tabela 3**).

Para avaliar as diferenças no sucesso dos ciclos com TEF e com TEC em função da idade da mulher realizou-se o teste *t* de medidas independentes. A um nível de significância de 5%, não existem evidências estatisticamente significativas de diferenças entre a ocorrência ou não de gravidez bioquímica e de gravidez clínica após TEF (**Anexo 3, Tabela 1**) ou após TEC (**Anexo 3, Tabela 2**) ($p>0,05$).

A idade associada ao sucesso após TEC é, em geral, muito semelhante à idade associada ao sucesso após TEF (**Gráfico 1**).

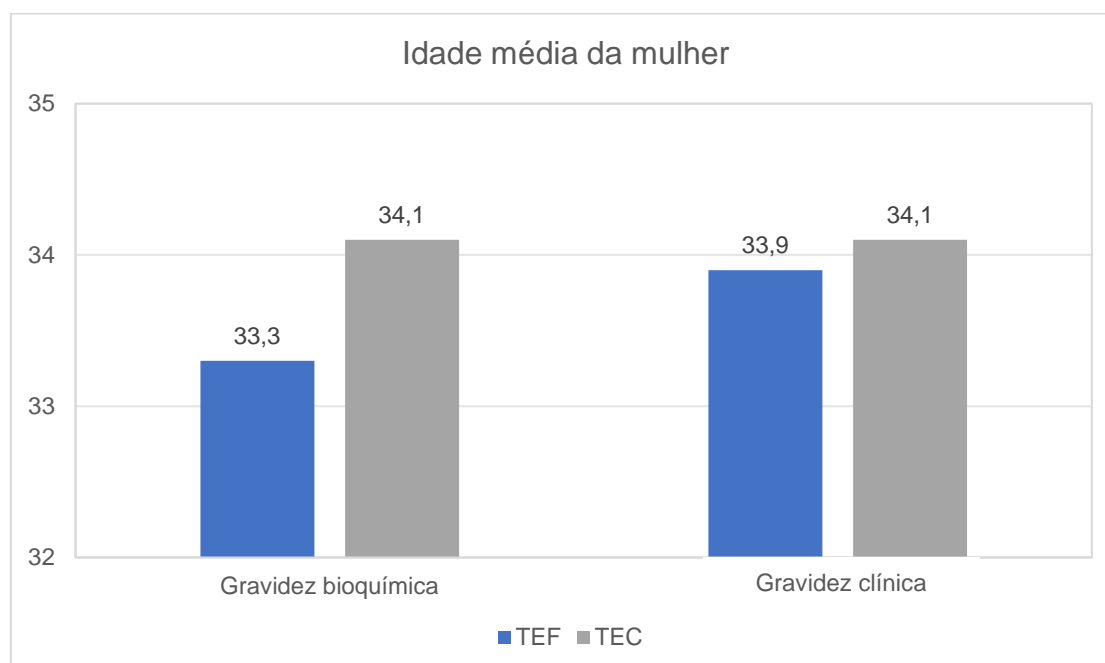


Gráfico 1. Idade média da mulher associada à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento).

3.2 A influência do número de oócitos recuperados na punção no sucesso do ciclo

No total da população inserida no estudo a média de oócitos recuperados na punção folicular é $13,6 \pm 5,81$ (Mín.= 3; Máx.= 35) (**Tabela 3**).

De modo a avaliar as diferenças no sucesso dos ciclos com TEF e com TEC em função do número de oócitos recuperados realizou-se o teste *t* de medidas independentes. A um nível de significância de 5%, não existem evidências estatisticamente significativas de diferenças entre a ocorrência ou não de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (**Anexo 4, Tabela 1**) ou após TEC (**Anexo 4, Tabela 2**) ($p > 0,05$). No entanto a diferença entre o número de oócitos recuperados associados à ocorrência ou não de gravidez bioquímica após TEF é considerada marginalmente significativa ($t = 1,672$; $p = 0,096$), estando um menor número de oócitos recuperados associados à ocorrência de gravidez (**Anexo 4, Tabela 1**).

A média do número de oócitos recuperados associados a sucesso após TEF é, em geral, menor que a média associada ao sucesso após TEC (**Gráfico 2**).

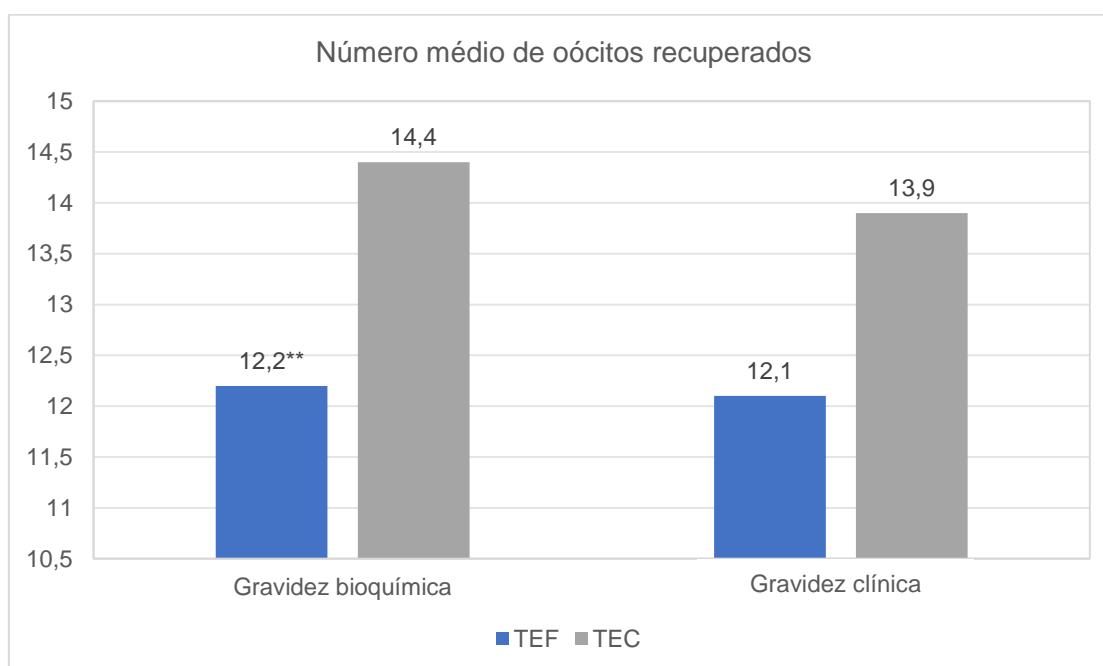


Gráfico 2. Número médio de oócitos recuperados associado à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento). ** diferença estatisticamente marginalmente significativa ($p < 0,10$).

3.3 A influência da taxa de fecundação no sucesso do ciclo

Na população total inserida no estudo a taxa de fecundação tem um valor médio de $78,3\% \pm 14,74\%$ (Mín.= 33,3%; Máx.= 100%) (**Tabela 3**).

Para averiguar as diferenças no sucesso dos ciclos com TEF e com TEC em função da taxa de fecundação realizou-se o teste t de medidas independentes. A um nível de significância de 5%, existem evidências estatisticamente significativas de diferenças entre a ocorrência ou não de gravidez bioquímica no momento de TEF ($t = -2,112$; $p = 0,036$), devido à média mais elevada da taxa de fecundação nos sujeitos com registo de gravidez bioquímica (77,1% vs 82,6%) (**Anexo 5, Tabela 1**).

Para o mesmo nível de significância, não existem evidências estatisticamente significativas de diferenças entre a ocorrência ou não de gravidez clínica para a TEF e de gravidez bioquímica e clínica para a TEC ($p > 0,05$) (**Anexo 5, Tabela 2**).

De um modo geral verifica-se que a média da taxa de fecundação associada ao sucesso após TEF é superior à média associada ao sucesso após TEC (**Gráfico 3**).

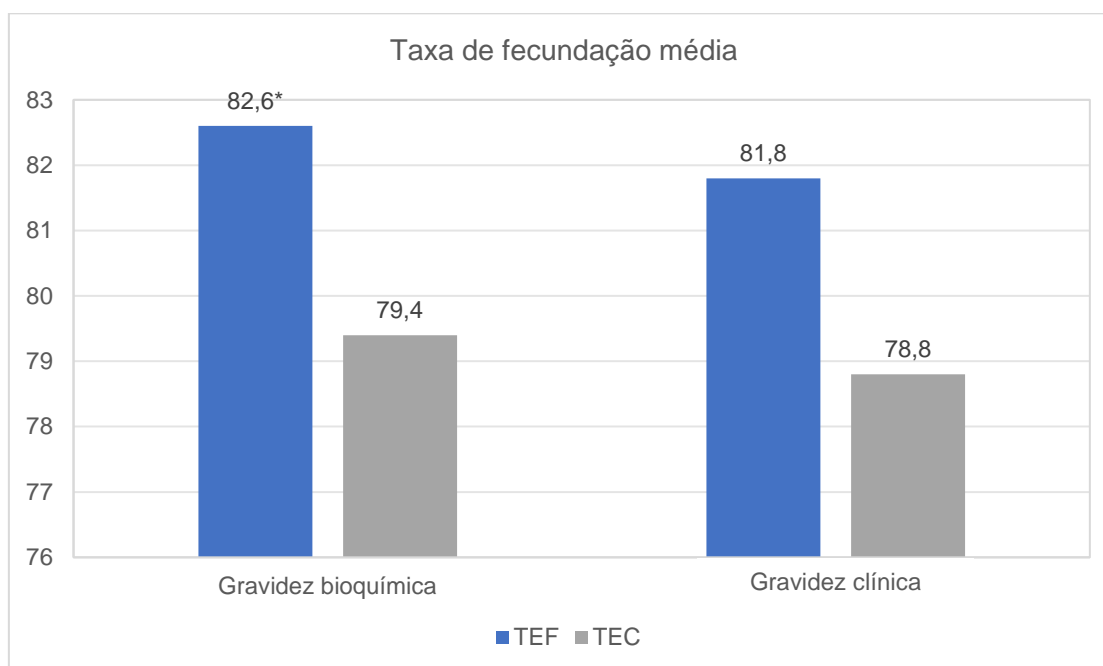


Gráfico 3. Taxa de fecundação média associada à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento). * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3.4 A influência da qualidade embrionária no sucesso do ciclo

No total dos 179 casos inseridos no estudo, foram transferidos em TEF 151 embriões de qualidade superior, 24 de qualidade intermédia e 4 de pior qualidade. Nas TEC foram transferidos 129 embriões de qualidade superior, 43 de qualidade intermédia e 7 de qualidade inferior.

Para avaliar a influência da qualidade embrionária no sucesso do ciclo após TEF e após TEC realizou-se o teste do quiquadrado de independência ou o teste de razão de verossimilhança (LR, do inglês *likelihood ratio*). A um nível de significância de 5% verifica-se que não existem evidências estatisticamente significativas para rejeitar a hipótese nula da independência entre a qualidade embrionária e a gravidez bioquímica ou a gravidez clínica ($p > 0,05$), indicando a ausência de associação entre estas variáveis (Tabela 6).

Tabela 6. Teste do quiquadrado de independência e teste de LR entre a qualidade embrionária e as variáveis gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF e após TEC. GI – graus de liberdade.

		χ^2	LR	gl	p
Ciclos com TEF	Gravidez bioquímica	-	2,215	2	0,330
	Gravidez clínica	-	1,201	2	0,548
Ciclos com TEC	Gravidez bioquímica	-	0,204	2	0,903
	Gravidez clínica	0,156	-	2	0,9025

3.5 A influência da espessura do endométrio no ciclo a fresco no sucesso dos ciclos com TEF e com TEC

Na população total inserida a espessura endometrial no ciclo a fresco tem um valor médio de $10,0 \pm 2,10$ mm (Mín = 4,1; Máx. = 15) (**Tabela 3**).

Para averiguar as diferenças no sucesso dos ciclos com TEF e com TEC em função da espessura do endométrio, realizou-se o teste *t* de medidas independentes. A um nível de significância de 5%, não existem evidências estatisticamente significativas de diferenças entre a ocorrência ou não de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (**Anexo 6, Tabela 1**) ou após TEC (**Anexo 6, Tabela 2**) ($p > 0,05$).

De um modo geral verifica-se que a média da espessura endometrial associada ao sucesso após TEF é inferior à média associada ao sucesso após TEC (**Gráfico 4**).

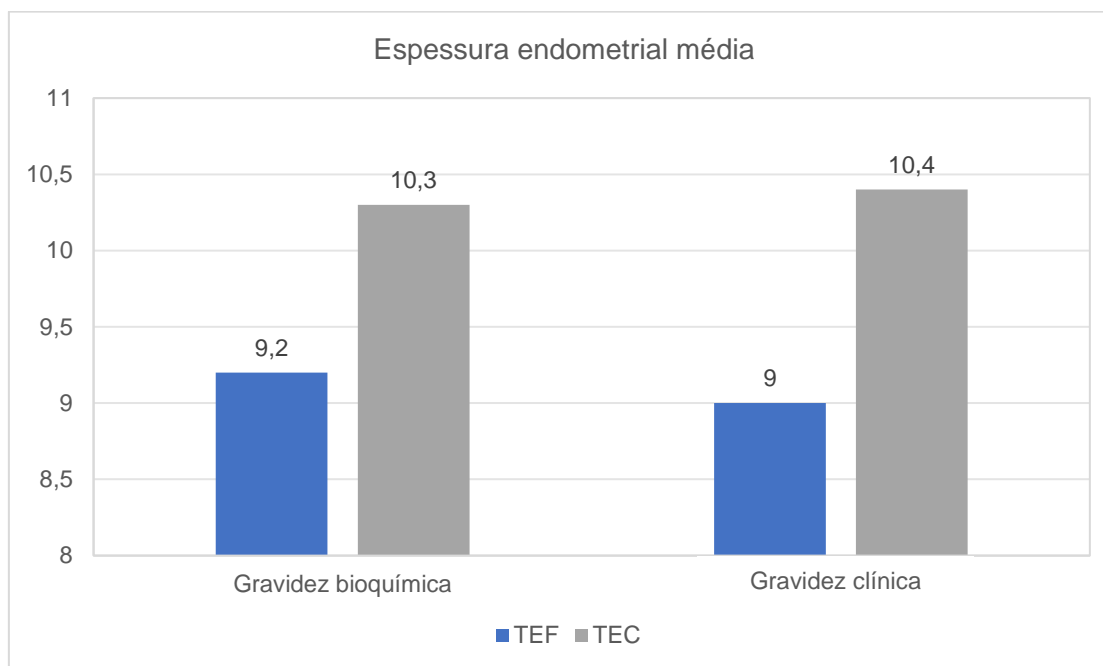


Gráfico 4. Espessura endometrial média associada à ocorrência de gravidez bioquímica e gravidez clínica após TEF (azul) ou após TEC (cinzento).

3.6 A influência da preparação endometrial no sucesso dos ciclos com TEC

Para compreender se o método de estimulação hormonal utilizado num ciclo de TEC tem influência no seu sucesso realizou-se o teste de quiquadrado.

A um nível de significância de 5%, pelo teste do quiquadrado de independência verifica-se que existem evidências estatisticamente significativas para rejeitar a hipótese nula da independência entre o ciclo de estimulação e a gravidez ectópica (LR=4,027; $p=0,045$) (**Tabela 7**), indicando a relação entre as variáveis, devido à maior probabilidade (58,7%) de não ocorrência de gravidez ectópica num ciclo natural (**Anexo 7, Tabela 1**).

Para as restantes medidas do sucesso, não existem evidências estatisticamente significativas para rejeitar a hipótese nula da independência ($p>0,05$), pelo que a variável ciclo de estimulação e as variáveis gravidez bioquímica e gravidez clínica não estão relacionadas (**Tabela 7**).

Tabela 7. Teste do quiquadrado de independência entre o ciclo de estimulação e as variáveis TEC. * associação estatisticamente significativa ($p<0,05$). Gl – graus de liberdade.

	χ^2	LR	gl	p
Gravidez bioquímica	0,204	---	1	0,651
Gravidez clínica	1,471	---	1	0,225
Gravidez ectópica	---	4,027	1	0,045*

Capítulo V

Discussão

1. Sucesso do ciclo após TEF e TEC

Um dos objetivos do presente trabalho era perceber que momento de transferência estaria associado a maior sucesso. Os resultados obtidos neste estudo retrospectivo demonstram que a transferência de embriões criopreservados está associada a uma taxa de gravidez (bioquímica e clínica) e parto significativamente superior, em comparação com a transferência de embriões a fresco (**Tabela 4**). Relativamente a taxa de gravidez ectópica e taxa de abortamento, não foram encontradas diferenças significativas entre as duas estratégias de transferência embrionária. Como já foi mencionado os resultados obtidos relativamente ao parto e abortamento não deverão ser considerados adiante devido à falta de dados em numerosos casos, enviesando a amostra e comprometendo a validade do estudo.

Estes resultados vão ao encontro do esperado e terão uma explicação fisiológica. A estimulação hormonal com gonadotrofinas, a que a mulher é sujeita no ciclo a fresco para estimulação ovárica, provoca níveis hormonais suprafisiológicos. A recetividade endometrial está dependente da decidualização do endométrio (*Introdução – 3.1. Fisiologia da implantação embrionária*) e qualquer alteração neste processo poderá ter implicações negativas na implantação. As hormonas sexuais, estrogénio e progesterona, são as principais responsáveis pela implantação e, de facto, há resultados que sugerem que níveis suprafisiológicos de progesterona prejudicam a decidualização – a estimulação ovárica com FSH provoca um aumento precoce dos níveis de progesterona, fazendo com que o endométrio entre em estado recetivo antes do tempo, causando uma assincronia entre o endométrio e o blastocisto (Lawrenz *et al.*, 2018) – e que a implantação é favorecida por níveis reduzidos de estrogénio (Ma *et al.*, 2003; Su-Mi and Jong-Soo, 2017) .

A implantação embrionária é intrinsecamente dependente da sincronia entre o blastocisto e o endométrio recetivo. A desregulação hormonal existente num ciclo a fresco provoca uma deslocação temporal da janela de implantação, impossibilitando a implantação do embrião transferido nesse momento. Num ciclo de transferência de embriões criopreservados, porque não é realizada a estimulação ovárica controlada, os níveis hormonais serão mais próximos do valor fisiológico, pelo que o processo de decidualização decorrerá normalmente e o endométrio estará em estado recetivo no momento em que o blastocisto se encontra na cavidade uterina. Esta hipótese é suportada por um estudo que indica que a estimulação hormonal tem efeitos negativos na taxa de nascimentos vivos no ciclo a fresco mas não se reflete na mesma taxa em posteriores ciclos com TEC, recomendando a criopreservação de embriões a pacientes

a quem tenha sido administrada uma elevada dose de gonadotrofinas (Munch *et al.*, 2017).

A realização de estudos em casos de doação de embriões também suporta esta teoria – a taxa de gravidez em transferências a fresco é superior nas recetoras e é semelhante entre TEF e TEC. Estes dados apontam para que a deficiente preparação endometrial, em resultado da estimulação hormonal a que a dadora é sujeita, mas não a recetora, seja a explicação para a falha na obtenção de gravidez (Check *et al.*, 2001).

Além da maior recetividade do endométrio, outra das hipóteses que poderá explicar o maior sucesso da TEC será a seleção embrionária a que estes serão sujeitos com a criopreservação. Em teoria, os embriões que sobreviverem ao processo de vitrificação e desvitrificação serão superiores, por resistirem ao *stress* imposto por este método de preservação (Shih *et al.*, 2008; Vladimirov *et al.*, 2018).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho são reportados em trabalhos idênticos, comparando o sucesso da transferência de embriões criopreservados com o sucesso da transferência de embriões a fresco – Wang *et al.* mencionam taxas de gravidez significativamente superiores após TEC e Li *et al.* mencionam taxas de nados vivos também significativamente superiores em ciclos com TEC, embora neste último caso apenas para transferência de blastocistos (Li *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). A taxa de nados vivos após transferência de embriões em clivagem após desvitrificação era significativamente superior para a TEF, sugerindo que a TEC em fase de blastocisto deverá, quando possível, ser preferida. No presente trabalho não foi feita a divisão dos ciclos consoante o estágio de desenvolvimento embrionário pelo que não poderá ser avaliada esta relação.

Os resultados obtidos vêm deste modo reiterar o maior sucesso obtido após a transferência de embriões criopreservados.

Todavia, devido à existência de dados que apontam para que a TEC não seja uma opção universal, um dos objetivos deste trabalho era compreender que dados poderiam ser utilizados à partida para fazer a escolha entre transferência a fresco ou transferência após criopreservação dos embriões. Para tal a população foi dividida em grupos de acordo com a idade feminina. Após a caracterização dos grupos em relação às variáveis em estudo, avaliou-se a relação entre o sucesso do ciclo e a idade, o número de óocitos recuperados, a taxa de fecundação, a qualidade embrionária, a espessura endometrial e a preparação endometrial (no caso das TEC).

A taxa de gravidez bioquímica e gravidez clínica foram calculadas para os três grupos registando-se, tal como esperado, taxas superiores para a transferência de embriões criopreservados, sendo que a taxa de gravidez clínica após TEC é cerca de

duas vezes superior à mesma após TEF em todos os grupos (**Tabela 5**); para o grupo B, exclusivamente, as taxas de gravidez bioquímica e clínica foram significativamente superiores após TEC.

1.1. Idade feminina

A idade da mulher é um fator relacionado com o sucesso da concepção, quer naturalmente quer através de tratamentos de PMA. O avanço da idade está relacionado com a redução da reserva ovárica e a diminuição da qualidade dos oócitos, sendo por isso um fator clinicamente importante durante um ciclo de PMA.

Este estudo inclui, em TEF e em TEC, a mesma população sendo importante ter em atenção que a distribuição de idades será muito semelhante em ambos os momentos – após uma eventual falha no ciclo a fresco, o casal regressa para novo tratamento dentro de um ano sensivelmente.

Estabelecendo uma comparação entre grupos, as taxas de gravidez bioquímica e clínica foram semelhantes no ciclo a fresco. Nas transferências de embriões criopreservados os grupos B e C apresentam taxas superiores ao grupo A, embora as diferenças não sejam significativas (**Tabela 5**).

Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre a ocorrência ou não de gravidez após TEF ou TEC, de acordo com a idade já que as médias de idade associadas ao sucesso em cada um dos momentos é muito semelhante (**Gráfico 1 e Anexo 3**).

Um estudo sobre o mesmo tema registou taxas de nados vivos significativamente inferiores em TEC para mulheres com idade inferior a 35 anos e taxas significativamente superiores em TEC para mulheres com idade igual ou superior a 38 anos, sugerindo que em mulheres de idade avançada esta deve ser a estratégia preferida (Keenan *et al.*, 2017). A tendência da superioridade da TEC em mulheres de idade avançada verifica-se também neste estudo, em que os grupos B e C apresentam taxas de gravidez clínica superiores ao grupo A em TEC (28,9 e 28,1 vs 24,0, respetivamente; $p>0,05$), mas taxas muito semelhantes em TEF (13,4 e 14,0 vs 12,0, respetivamente; $p>0,05$) (**Tabela 5**). Em teoria, em mulheres mais velhas (com idade \geq a 38 anos) a estimulação hormonal terá de ser mais forte, sendo necessária uma maior dose de gonadotrofinas para a adequada estimulação ovárica. Devido à maior dosagem hormonal a que serão sujeitas a preparação endometrial síncrona com o desenvolvimento embrionário será comprometida e a probabilidade de implantação num ciclo a fresco será menor (Borges *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos em conjunto com a informação constante na literatura citada, sugerem que o grupo B poderá não beneficiar da TEC pelo que a preferência da TEC se acentua no grupo C, em mulheres de idade avançada.

1.2. Número de oócitos recuperados

O número de oócitos recuperados na punção depende sobretudo da idade da mulher e da estimulação ovárica que é realizada. O envelhecimento provoca uma redução da reserva ovárica e um aumento da resistência do ovário à estimulação com FSH, fazendo com que um menor número de oócitos seja recuperado em mulheres de idade avançada (Ferraretti *et al.*, 2011). O declínio da fertilidade inicia por volta dos 30 anos de idade pelo que neste grupo é expectável a recuperação de um menor número de oócitos (Tan *et al.*, 2014).

Este fator é importante para um ciclo de PMA – a recuperação de um maior número de oócitos reflete-se num maior número de embriões em desenvolvimento, com maior probabilidade de obtenção de blastocistos, oferecendo ao embriologista maior possibilidade de seleção embrionária (Cai *et al.*, 2013; Vaughan *et al.*, 2017).

Nos grupos A, B e C foi obtido um número muito semelhante de oócitos, tendo o grupo B uma média superior (13,78 oócitos) (**Tabela 5**), ao contrário do que seria esperado, embora a diferença não seja significativa ($p>0,05$).

Neste estudo verificou-se uma diferença significativa entre o número de oócitos recuperados e a ocorrência de gravidez bioquímica num ciclo a fresco (**Gráfico 2 e Anexo 4**), verificando-se uma tendência para um menor número médio de oócitos recuperados associados ao sucesso em TEF (≈ 12 oócitos) que a média associada ao sucesso em TEC (≈ 14 oócitos) (**Anexo 4**).

O número médio de oócitos obtidos para os grupos A, B e C (**Tabela 5**) aproxima-se da média associada ao sucesso após TEC (**Anexo 4 - Tabela 2**). Contudo, por serem valores muito idênticos entre grupos, não será possível concluir sobre o recurso ao número de oócitos recuperados como critério de seleção do método de transferência para os grupos definidos.

A tendência observada neste estudo acompanha o que era expectável. Duas recentes meta-análises referem que a TEC deve ser preferida à TEF quando o número de oócitos recuperados é superior a 15, mas não quando é inferior a este valor (Dieamant *et al.*, 2017; Roque *et al.*, 2018). A explicação para esta recomendação repete-se: um maior número de oócitos recuperados estará associado a uma estimulação hormonal mais intensa, que proporciona a deslocação da janela de implantação e reduz a probabilidade de gravidez.

A recuperação de mais de 11 folículos na punção está associada a um maior risco de SHO. Esta complicação iatrogénica pode surgir durante a estimulação hormonal com gonadotrofinas, após a administração de hCG para induzir a maturação de oócitos e ou, em caso de gravidez, pelo aumento dos níveis de hCG, secretados pela placenta. Esta síndrome pode manifestar-se em leves sintomas e resolver-se espontaneamente ou, em casos graves, ser letal pelo que é crucial apostar na prevenção (Fiedler and Ezcurra, 2012). A criopreservação de oócitos ou embriões, adiando transferência de embriões e a hipótese de gravidez, tem demonstrado ser um método seguro de reduzir o risco de SHO (Roque *et al.*, 2018). Por esse motivo, este deve ser o procedimento recomendado quando a paciente reúne condições que representem risco de desenvolvimento desta síndrome.

O presente estudo não analisou a incidência do risco de SHO em função da técnica de transferência, uma vez que às pacientes com maior risco de SHO já são recomendados o adiamento de transferência e a criopreservação de embriões, com posterior TEC.

1.3. Taxa de fecundação

A taxa de fecundação é, por si só, um método indicador do sucesso do ciclo, sendo tanto maior quanto maior o estado de maturação dos oócitos recuperados. A maturação, nuclear e citoplasmática, desta célula é determinante não só para o sucesso da fecundação como para o posterior desenvolvimento embrionário (Swain and Pool, 2008).

A taxa de fecundação média mais alta acontece no Grupo A (83,71%), sendo as taxas dos grupos B e C inferiores (76,83% e 78,55%, respetivamente), embora as diferenças não sejam significativas ($p > 0,05$) (**Tabela 5**). A literatura atual diverge no que respeita à relação entre a idade materna e a taxa de fecundação, no entanto Yan *et al.* reportam taxas de fertilização inferiores em mulheres com idade superior a 30 anos, suportando as tendências verificadas neste trabalho (Yan *et al.*, 2012; Grøndahl *et al.*, 2017). Uma explicação para a diminuição da taxa de fecundação com a idade poderá ser a interferência da idade materna na expressão de genes oocitários envolvidos em funções importantes como a regulação do ciclo celular e a estabilidade cromossómica, a estrutura do citoesqueleto, determinadas vias metabólicas, o controlo da transcrição e a resposta ao *stress* (Steuerwald *et al.*, 2007).

Quando avaliado o sucesso do ciclo de TEF e TEC em relação com a taxa de fecundação registaram-se resultados significativos para a taxa de gravidez bioquímica em TEF ($82,6 \pm 13,7$; $p = 0,036$) (**Gráfico 3 e Anexo 5**). De um modo geral a taxa de

fecundação associada ao sucesso dos ciclos de TEC é menor que a associada aos ciclos de TEF.

Tanto quanto foi possível apurar, não há trabalhos que estabeleçam esta relação, entre a taxa de fecundação e o sucesso do ciclo a fresco ou de um ciclo com TEC. Num estudo sobre as duas estratégias de transferência em ciclos com diagnóstico genético pré-implantação (DGPI)⁵, em que é registada a taxa de fecundação em ciclos com TEF e com TEC estes valores são muito semelhantes (78% vs 77%, respetivamente), ainda que a análise estatística não tenha incidido sobre esta variável. Noutro trabalho semelhante, em que não foi avaliada a diferença estatística entre as variáveis, registam-se também valores superiores de taxa de fecundação em ciclo com TEF em relação a ciclos com TEC (Acharya *et al.*, 2018).

Os valores de taxa de fecundação obtidos para o grupo A (83,7%) (**Tabela 5**) aproximam-se da taxa de fecundação média associada a sucesso em TEF (**Anexo 5 - Tabela 1**). Sendo este o grupo em que a taxa de gravidez em TEC é menor, e tratando-se do grupo de mulheres mais jovens em que a estimulação hormonal será menos intensa, pode sugerir-se que para o grupo A seja dada a oportunidade de transferência a fresco. Os valores de taxa de fecundação dos grupos B e C, contudo, aproximam-se da taxa de fecundação média associada ao sucesso em TEC, momento em que ambos os grupos registam maior taxa de gravidez. Apesar da relevância deste dado para um ciclo de PMA os resultados obtidos são dúbios e não demonstram que possa ser usado como um critério claro de seleção para TEF ou TEC para todos os grupos.

1.4. Qualidade embrionária

A qualidade embrionária pode ser um dos motivos para a falha na implantação dado que este é um processo dinâmico que envolve a interação entre um blastocisto e o endométrio em estado recetivo.

Na análise da relação entre sucesso de ciclos com TEF ou TEC e a qualidade embrionária não foram encontrados resultados significativos (**Tabela 6**). Este resultado deve ser interpretado cuidadosamente uma vez que a qualidade embrionária é conhecidamente importante para o sucesso do ciclo, estando relacionada com o potencial de implantação do embrião. A ausência de significância estatística, contudo

⁵ DGPI é uma ferramenta que evoluiu bastante nas últimas décadas, tendo como objetivo principal definir se um embrião é afetado por uma doença monogénica ou anomalias cromossómicas, prevenindo e limitando os riscos da transferência de um embrião com anomalias cromossómicas (falha na implantação e aborto). O DGPI pode ser realizado em várias fases do desenvolvimento embrionário, na condição de que a sua manipulação durante a biópsia embrionária preserve a viabilidade e potencial reprodutivo (Cimadomo *et al.*, 2016).

aponta para que a justificação para as diferenças no sucesso do ciclo deva incidir na preparação do endométrio. O facto de, no geral, terem sido transferidos um menor número de embriões de melhor qualidade em TEC e as taxas de gravidez serem, ainda assim, superiores, alinha com esta justificação (**Tabela 5**).

Num estudo que estabelece a comparação entre o sucesso de TEF e TEC após transferência de blastocistos euploides, as taxas de gravidez e de nados vivos foram significativamente superiores em ciclos com transferência de embriões criopreservados (Coates *et al.*, 2017). Este estudo, realizado apenas com embriões euploides, realça assim a importância da preparação endometrial e o papel secundário da qualidade embrionária nas diferenças entre o sucesso em TEF e TEC.

No presente trabalho foram incluídos casos com transferência de embriões em clivagem e blastocistos podendo argumentar-se que embriões em clivagem, mesmo que com aparente boa qualidade, podem falhar o desenvolvimento até blastocisto. Ainda, a qualidade embrionária foi avaliada apenas com base na morfologia, pelo que pode considerar-se que não foi usado o melhor método de seleção embrionária. É um método simples e não invasivo, no entanto, embora haja correlação entre a morfologia e a probabilidade de implantação, não é o método mais robusto – frequentemente embriões com boa morfologia falham a implantação e embriões com pior classificação são capazes de implantar. Além disso a avaliação da morfologia requer, geralmente, a observação dos embriões diariamente em momentos definidos, procedimento que interfere com as condições ótimas de cultura embrionária (Pribenszky *et al.*, 2017).

Atualmente estão disponíveis outros métodos de seleção embrionária. A cultura embrionária monitorizada com *time-lapse* permite a cultura embrionária ininterrupta e, através da captura de imagens em intervalos de tempo definidos, o acompanhamento do desenvolvimento embrionário de forma contínua. A obtenção de informação sobre as alterações morfológicas e cinéticas (sobretudo da dinâmica da divisão celular), francamente estudadas e relacionadas com a probabilidade de implantação e gravidez, permite uma melhor seleção embrionária (Milewski and Ajduk, 2017; Pribenszky *et al.*, 2017).

Outro método de seleção embrionária é o DGPI, com especial destaque para a vertente PGT-A (Diagnóstico Genético Pré-implantação de Aneuploidias, do inglês *Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies*). Esta técnica, desenvolvida com o objetivo de aumentar o sucesso dos tratamentos de infertilidade, permite a análise dos 24 cromossomas e transferência exclusiva de embriões diagnosticados como euploides (Penzias *et al.*, 2018). A aneuploidia pode ser a causa da falha de implantação em embriões morfollogicamente normais selecionados para transferência, realçando a importância do apuramento das técnicas de seleção embrionária (Majumdar *et al.*,

2017). O PGT-A exige a biópsia embrionária e, geralmente, a sua criopreservação uma vez que os resultados não são obtidos a tempo de a transferência ser realizada a fresco. A biópsia pode ser realizada ao 3º dia de desenvolvimento, quando o embrião tem, pelo menos, 6 células (Harton *et al.*, 2011; Cimadomo *et al.*, 2016). Esta técnica tem a desvantagem de atuar mais a jusante no desenvolvimento embrionário pelo que a remoção de uma célula, de um *pool* tão reduzido, poderá comprometer o desenvolvimento subsequente até blastocisto (Cimadomo *et al.*, 2016). A biópsia também pode ser aplicada em células da trofoectoderme em blastocistos, ao 5º ou 6º dia de desenvolvimento (Cimadomo *et al.*, 2016). A biópsia de células da trofoectoderme é mais robusta em termos técnicos e biológicos – como permite a aspiração de uma maior quantidade de material biológico há menor risco de erros dos procedimentos de diagnóstico, um menor impacto do mosaicismo (presença de duas ou mais linhagens celulares no embrião (Chuang *et al.*, 2018)) na análise molecular (Cimadomo *et al.*, 2016) e um menor impacto no próprio desenvolvimento embrionário – as células da trofoectoderme removidas representam uma menor proporção do embrião e não estão envolvidas no desenvolvimento fetal propriamente dito, não sendo conhecidas as implicações no processo de implantação, no qual têm um importante papel (Penzias *et al.*, 2018).

Um recente trabalho de revisão reconhece que o PGT-A, em conjunto com o *time-lapse*, a genómica, transcriptómica e metabolómica, serão ferramentas essenciais para uma análise e seleção embrionária multidimensional, no entanto não recomenda a sua aplicação indiscriminada a todos os casais inférteis (Penzias *et al.*, 2018) sendo que mulheres com idade superior a 35 anos poderão beneficiar particularmente da aplicação do PGT-A, já que a taxa de aneuploidia aumenta com a idade (Majumdar *et al.*, 2017; Munne *et al.*, 2017).

1.5. Espessura do endométrio

A recetividade do endométrio parece ser um dos aspetos mais relevantes para o sucesso do ciclo e vários métodos têm sido introduzidos ao longo dos tempos para fazer a sua avaliação.

A avaliação da recetividade do endométrio com recurso ao controlo ecográfico, com observação da espessura endometrial, do padrão trilaminar característico desta estrutura e, com o auxílio de outros métodos, do fluxo sanguíneo no endométrio é uma prática comum entre os profissionais por se tratar de um método não invasivo, no entanto, a literatura diverge em relação ao poder preditivo desta análise no sucesso do ciclo (Singh *et al.*, 2011b; Kasius *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018).

Um trabalho de revisão reconhece que a espessura endometrial terá uma capacidade limitada de identificar o desfecho do ciclo e que o limiar de 7mm, largamente utilizado, estará relacionado com menor probabilidade de gravidez, mas acontecerá raramente. Kasius *et al.* não recomendam a utilização da espessura do endométrio como fator de decisão entre TEF e TEC (Kasius *et al.*, 2014). Trabalhos publicados mais recentemente reconhecem, no entanto, que a espessura endometrial pode ser um aspeto independente de predição de gravidez, gravidez ectópica e abortamento espontâneo, validando o limiar de 7mm. Desta forma recomendam que, verificando-se uma espessura endometrial abaixo deste valor no dia da administração de hCG, se considere o cancelamento do ciclo a fresco dado que estas mulheres terão menor probabilidade de concepção e, caso aconteça, maior risco de gravidez ectópica ou aborto espontâneo (Yuan *et al.*, 2016).

No sentido de avaliar se a espessura do endométrio no ciclo a fresco pode ser utilizada como um critério de escolha da estratégia de transferência, avaliou-se a relação do sucesso do ciclo, após TEF e após TEC, com a espessura endometrial medida no dia da punção folicular não tendo sido encontradas diferenças significativas em nenhum dos momentos (**Gráfico 4** e **Anexo 6**).

A média da espessura endometrial associada ao sucesso após TEF ($\approx 9\text{mm}$) é ligeiramente inferior à média associada ao sucesso após TEC ($\approx 10\text{mm}$) (**Anexo 6**). A medida da espessura endometrial nos grupos A, B e C ronda os 10mm (**Tabela 5**) e, por serem valores muito semelhantes para os três grupos não é possível concluir sobre o recurso à espessura endometrial como critério de seleção do método de transferência para os grupos definidos.

A espessura endometrial média dos grupos nas TEC ronda os 8,5mm (**Tabela 5**) e este momento está associado a maior taxa de gravidez clínica. Uma vez que este valor é algo diferente do valor associado ao sucesso após TEC ($\approx 10\text{mm}$) pode discutir-se que a espessura endometrial não será a melhor indicação do sucesso do ciclo, mas antes a preparação endometrial hormonal propriamente dita.

Fruto do contínuo esforço no sentido de desenvolver técnicas que permitam ao corpo clínico determinar a melhor altura de transferência foi desenvolvido o teste ERA[®] (iGenomix) (do inglês *Endometrial Receptivity Analysis*) e, mais recentemente, o teste ERPeak[®] *Endometrial Receptivity Test* (CooperSurgical). Estes testes têm como objetivo, através da análise da expressão de genes envolvidos na recetividade do endométrio, determinar a janela de implantação e o dia de maior recetividade endometrial (Bertolín, 2017; CooperSurgical, 2019). Os testes permitem a análise de

uma amostra do endométrio colhida por biópsia em ciclos naturais ou com estimulação hormonal, consoante a estratégia de preparação do endométrio que seja escolhida para a sequente transferência; esta análise não está disponível para ciclos a fresco com estimulação ovárica controlada (Bertolín, 2017). O resultado permite datar o endométrio, classificando-o como pré-recetivo, recetivo ou pós-recetivo – se o teste classificar o endométrio como recetivo o método de preparação hormonal do endométrio é validado permitindo agendar a transferência dos embriões criopreservados para o momento em que a implantação será mais provável; quando o resultado é diferente é dada informação sobre o desvio da situação ótima de recetividade permitindo ao clínico ajustar a estimulação hormonal e determinar o momento da transferência com ou sem a realização de uma nova biópsia (Simón, 2016; Bertolín, 2017; CooperSurgical, 2019).

Os estudos apontam para que o teste ERA[®] seja atualmente o método mais preciso na apreciação da recetividade do endométrio, permitindo determinar a janela de implantação de forma mais personalizada para cada paciente (Mahajan, 2015). Reconhece-se o particular interesse deste teste para pacientes com falha recorrente de implantação⁶ podendo a sua utilização não apresentar vantagem em pacientes com bom prognóstico (Bassil *et al.*, 2015). Relativamente ao segundo teste, por ser mais recente os estudos sobre a transferência embrionária e o resultado clínico após recurso ao ERPeak[®] ainda estão em curso (CooperSurgical, 2019).

Estes estudos poderiam ser uma ferramenta interessante para os grupos inseridos neste estudo já que a espessura endometrial não foi dada como um critério claro na seleção entre TEF e TEC, enfatizando a necessidade de novos métodos de avaliação da preparação endometrial hormonal, que aparenta ter um maior impacto nesta decisão.

Os resultados obtidos, em conjunto com a literatura atual, são relativamente uniformes na indicação de que a preparação hormonal do endométrio seja a principal responsável pela diferença entre o sucesso obtido após TEF ou após TEC.

Uma hipótese válida para melhor seleção dos casos será a deslocação da atenção para a estimulação hormonal realizada no início do ciclo. O supramencionado aumento precoce de progesterona (*Introdução – 5. Transferência de embriões criopreservados*) tem um efeito prejudicial na sincronia do endométrio com o blastocisto

⁶ A falha recorrente de implantação é definida como a falha na obtenção de gravidez clínica após transferência de, pelo menos, quatro embriões de boa qualidade num mínimo de três ciclos a fresco ou com embriões criopreservados, em mulheres com idade inferior a 40 anos (Coughlan *et al.*, 2014).

capaz de implantação, proporcionando reduzidas taxas de gravidez em ciclos a fresco. Uma das soluções apontadas numa revisão recente era a alteração do grau de estimulação no final da fase folicular ou o doseamento de progesterona, com segmentação do ciclo e posterior TEC se os níveis fossem elevados no dia de administração de hCG (Lawrenz and Fatemi, 2017).

Um estudo retrospectivo de 2016 apoia esta hipótese, demonstrando que níveis elevados de progesterona no dia de administração de hCG tem efeito negativo na taxa de nascimentos vivos nos ciclos com TEF mas não nas TEC posteriores, pelo que o adiamento da transferência será uma estratégia viável para ultrapassar os efeitos nocivos do excesso de progesterona (Healy *et al.*, 2016).

As dúvidas em relação a esta estratégia relacionam-se com o valor limiar de progesterona que deve ser considerado e com o momento do ciclo em que esta deve ser quantificada. Liu *et al.* referem resultados superiores, em termos de taxas de implantação, quando o doseamento de progesterona é realizado no dia antes e no dia após a injeção com hCG, ao invés de apenas num destes momentos (Liu *et al.*, 2015). O mesmo trabalho refere que esta estratégia deve ser considerada quando o nível de progesterona é normal num primeiro momento, mas elevado no doseamento após a administração de hCG. A confirmação de que os resultados nestes momentos se encontram acima do valor definido como normal permite à equipa clínica cancelar a transferência num ciclo a fresco, evitando o efeito prejudicial da assincronia do endométrio.

1.6. Estimulação hormonal num ciclo com TEC

Com o desenvolvimento dos sistemas de vitrificação e as elevadas taxas de sobrevivência após desvitrificação, a transferência de embriões criopreservados tornou-se uma técnica muito utilizada em PMA quer em mulheres com risco de SHO, quer para aumentar as possibilidades de gravidez cumulativa. Alguns estudos, anteriormente mencionados, referem taxas de sucesso muito semelhantes e até superiores associadas à transferência de embriões criopreservados.

A transferência de embriões, como anteriormente discutido, depende em grande magnitude da preparação endometrial de modo a transferir o embrião para cavidade uterina durante a janela de implantação. A transferência de embriões criopreservados pode ser realizada num ciclo natural – o desenvolvimento de um folículo dominante é acompanhado e a transferência é programada após a ovulação espontânea; num ciclo natural modificado – o desenvolvimento folicular natural é acompanhado e a ovulação é provocada pela administração de hCG; ou num ciclo artificial – é feita a estimulação

controlada dos ovários, com administração exógena de estrogénio e progesterona e, frequentemente de agonista de GnRH para impedir a ovulação espontânea (Guan *et al.*, 2016).

No presente trabalho avaliou-se a influência do tipo de preparação endometrial (ciclo natural modificado vs ciclo artificial) no sucesso do ciclo. Não foram encontradas relações significativas entre os dois métodos e a ocorrência de gravidez bioquímica ou clínica. Contudo, demonstrou-se uma relação significativa entre a ocorrência de gravidez ectópica e a preparação endometrial ($p = 0,045$) (**Tabela 7**) devido à maior probabilidade de não ocorrência de gravidez ectópica em ciclo natural (**Anexo 7 – Tabela 1**). Este resultado vai ao encontro do esperado, já que a literatura sugere que ciclos artificiais estão associados a maior risco de gravidez ectópica (Zhang *et al.*, 2013; Jing *et al.*, 2019). Para a transferência de embriões criopreservados em ciclo artificial não foi registado qualquer caso de gravidez ectópica, que só aconteceu após TEC em ciclo natural (**Anexo 7 – Tabela 1**), o que poderá ser explicado pelo menor número de ciclos artificiais registados.

Em ciclos artificiais a estimulação hormonal fará elevar os níveis hormonais para valores suprafisiológicos, tornando o ambiente uterino avesso à implantação embrionária e aumentando o risco de gravidez ectópica (Londra *et al.*, 2015). O mesmo trabalho sugere que o risco de gravidez ectópica será superior em ciclos a fresco do que em ciclos de transferência de embriões criopreservados sem hiperestimulação na mesma mulher, precisamente devido à influência negativa dos elevados níveis hormonais. Outros trabalhos não encontram diferenças entre ciclo natural e artificial no que respeita à gravidez ectópica (Acharya *et al.*, 2014; Lathi *et al.*, 2015). No presente trabalho a ocorrência de gravidez ectópica foi superior em TEC, embora sem diferenças significativas, e registou-se menor probabilidade de ocorrência em ciclo natural (**Anexo 7 – Tabela 1**), contrariando em parte as suposições relativamente ao efeito detrimental da estimulação hormonal.

Relativamente às taxas de sucesso associadas a cada método de preparação endometrial para transferência de embriões criopreservados não há consenso, com estudos a apontar para taxas de nados vivos semelhantes entre o ciclo natural modificado e o ciclo artificial (Groenewoud *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2017; Agha-Hosseini *et al.*, 2018) enquanto outros sugerem a superioridade de ciclo natural modificado (Guan *et al.*, 2016). Apesar de as taxas de gravidez bioquímica e clínica serem superiores em ciclo natural modificado, as diferenças não são significativas (**Anexo 7 – Tabelas 1 e 2**).

Este trabalho sugere então que a preparação endometrial num ciclo natural modificado esteja associada a menor risco de gravidez ectópica, pelo que nos grupos

em que for indicada a transferência de embriões criopreservados será preferível a sua realização num ciclo deste tipo.

2. Técnica de transferência embrionária

Relativamente ao procedimento da transferência embrionária propriamente dito transferências embrionárias difíceis poderão estar associadas a menores taxas de implantação e gravidez. O traumatismo do endométrio e a indução de contrações poderão ser as explicações para esta diminuição, reduzindo as probabilidades de implantação (Kava-Braverman *et al.*, 2017).

O objetivo da transferência deve ser a deposição atraumática do embrião no fundo uterino. A necessidade de recurso a cateteres extra, mais rígidos, ao tenáculo para ajustar a posição cervical ou a realização da transferência com má visualização ecográfica têm efeito negativo na taxa de gravidez (Kava-Braverman *et al.*, 2017). A resistência à expulsão do embrião do cateter e a presença de muco e sangue no cateter parecem não ter o mesmo efeito na taxa de gravidez mas, mais do que a presença ou ausência destes fatores deve ser avaliada a sua magnitude (Ghanem *et al.*, 2016; Kava-Braverman *et al.*, 2017).

O procedimento de transferência embrionária não foi avaliado neste trabalho, contudo deve ser tido em grande conta, de modo a valorizar os esforços da equipa médica e laboratorial até ao momento da transferência, assegurar o melhor cuidado para a paciente e maior probabilidade de sucesso.

3. Limitações do estudo

O presente trabalho estabeleceu a comparação entre TEF e TEC realizadas no mesmo casal, com embriões da mesma coorte transferidos nos diferentes momentos. A generalidade dos estudos sobre este tema estabelece comparação entre casais que tenham realizado transferência a fresco com casais que tenham realizado somente transferência de embriões criopreservados. Um estudo retrospectivo com esta comparação seria enviesado já que em determinados ciclos, quando a mulher apresenta risco de SHO, não é realizada transferência a fresco sendo os embriões criopreservados para posterior transferência. O ideal seria a realização de um estudo prospetivo em que cada caso fosse aleatoriamente selecionado para TEF ou TEC.

Ainda, apesar do desenho experimental aplicado neste trabalho minimizar as diferenças entre grupos, a ausência de uniformidade em dados como o número e estágio de desenvolvimento dos embriões transferidos poderá introduzir variabilidade e comprometer a comparabilidade dos dois momentos.

Uma das críticas que pode ser tecida ao trabalho é sua natureza retrospectiva, podendo determinados parâmetros ou fatores de risco dados atualmente como relevantes não terem sido registados no passado. A realização de um estudo prospetivo poderia auxiliar no esclarecimento de algumas dúvidas persistentes.

Pelo facto de este estudo incluir um intervalo de tempo considerável e se basear numa base de dados de registo comum, diferentes profissionais terão estado envolvidos nos registos tornando-os menos exatos e determinados procedimentos podem não ter sido realizados ou avaliados segundo os mesmos critérios durante todo o período analisado.

Capítulo VI

Conclusão

O objetivo do presente trabalho foi determinar o momento de transferência associada a maior sucesso e que critérios poderiam ser utilizados para decidir entre a transferência de embriões a fresco ou após criopreservação.

Os resultados obtidos permitem concluir que em mulheres de idade avançada, acima dos 35 anos, deve ser preferida a transferência de embriões criopreservados. Por outro lado, em mulheres mais jovens (< 30 anos) com taxas de fecundação elevadas (> 80%) será prudente a tentativa de transferência de embriões a fresco. A estimulação ovárica controlada realizada no ciclo a fresco eleva os níveis das hormonas que regulam a recetividade endometrial, provocando a dessincronização entre a janela de implantação e o estágio de desenvolvimento do embrião transferido. Em mulheres de idade avançada é geralmente aplicada uma maior dose hormonal (para estimulação ovárica num ciclo a fresco) que em mulheres mais jovens, salientando a vantagem da TEC nas primeiras e a preferência da TEF nas segundas. Relativamente aos restantes fatores estudados – número de oócitos recuperados, qualidade embrionária e espessura endometrial – não foi possível identificar critérios claros de escolha entre a TEF ou a TEC para os grupos definidos.

O número de oócitos recuperados merece, contudo, atenção devido à sua relação com a estimulação hormonal e o risco de SHO. A transferência de embriões criopreservados deve ser sugerida a mulheres com elevado risco de SHO, pelo caráter preventivo do adiamento da transferência.

Apesar da relevância da qualidade embrionária no sucesso do ciclo os procedimentos de criopreservação apresentam taxas de sobrevivência embrionária excelentes, não comprometendo o seu desenvolvimento, e este critério será menos decisivo na escolha entre transferência a fresco ou após criopreservação. A principal questão reside nos níveis hormonais, relacionados com a recetividade do endométrio. A espessura endometrial mostrou-se inadequada como critério de decisão entre os dois momentos de transferência, recomendando-se o investimento em testes mais complexos e eficazes que permitam uma definição concreta e personalizada da recetividade do endométrio. O doseamento de progesterona no dia da injeção com hCG merece atenção uma vez que poderá ser um método mais simples, mas igualmente eficaz, de decisão atempada entre a transferência a fresco ou o seu adiamento.

Os resultados obtidos permitem ainda concluir que, quando é recomendada a transferência de embriões criopreservados, esta deve ser realizada num ciclo natural modificado de modo que haja o mínimo de interferência com os níveis hormonais fisiológicos e maior probabilidade de sucesso.

Neste trabalho não foi avaliada a taxa de cancelamento da transferência de embriões criopreservados, um dado que pode ser muito relevante na decisão *a priori* entre a transferência no ciclo a fresco ou o adiamento da transferência.

Apurar os critérios de seleção do momento de transferência num centro de PMA permitirá discutir com o casal, *a priori* e com base nas características do seu ciclo, qual a melhor altura para transferência e com isto reduzir o tempo até a obtenção de gravidez e evitar a ansiedade associada ao insucesso de um ciclo.

A equipa clínica deve trabalhar no sentido de reunir a informação necessária para esclarecer o casal das vantagens e desvantagens de cada uma das estratégias de transferência. Na decisão entre o momento de transferência deve ser tido em conta o impacto que possa ter na estabilidade emocional o insucesso de um ciclo a fresco ou a espera até à transferência de embriões criopreservados, devendo a equipa clínica discutir com o casal a sua preferência. Será importante considerar, para o casal e para o centro de PMA, os custos eventualmente associados à criopreservação e/ou à medicação necessária numa posterior estimulação hormonal para TEC, que poderão ser determinantes na decisão.

Considerações finais

A presença diária na UMR do CHUSJ elucidou-me sobre a rotina de um centro de PMA, todo o pessoal envolvido nas diferentes etapas do processo e o esforço desempenhado por todas as partes para proporcionar aos casais inférteis a oportunidade de cumprir um desejo.

Relativamente às capacidades laboratoriais adquiridas ao nível do laboratório de andrologia foi possível a análise de parâmetros microscópicos, como sendo concentração, motilidade e morfologia de amostras seminais. Foi possível acompanhar a realização de espermogramas e o processamento de amostras seminais a fresco ou após criopreservação para uso nas diferentes técnicas de inseminação, embora não tenha sido realizado autonomamente. No bloco cirúrgico foi possível assistir a biópsias testiculares, aos procedimentos realizados pelo embriologista no bloco e ao processamento posterior em laboratório. Foi ainda possível observar a seleção de espermatozoides em amostras criopreservadas após biópsia testicular, em microscópio invertido, com e sem o recurso a pentoxifilina.

No laboratório de embriologia foi-me permitido assistir às punções foliculares, utilizando material excedentário para aperfeiçoar a técnica de triagem de complexos CCO. Acompanhada por embriologistas experientes, foi possível avaliar a maturação dos oócitos, monitorizar o desenvolvimento embrionário, registando a sua qualidade, e selecionar embriões para transferência. O material biológico que não atingisse os critérios de qualidade para transferência ou criopreservação foi mantido em cultura, tendo registado o seu desenvolvimento e selecionado o que seria viável para treino de criopreservação (vitrificação e desvitrificação) ou para treino da técnica de carregamento do cateter de transferência, procedimentos mais delicados e exigentes. Relativamente ao manuseamento de um microscópio invertido para ICSI, foi possível a sua utilização para seleção espermática, com amostras excedentárias. Nesta área foi possível ainda assistir a um procedimento mais esporádico e complexo – a ativação oocitária.

Tendo estagiado no único centro público do país que realiza DGPI foi possível assistir ao longo do ano à realização de biópsias embrionárias de embriões em clivagem e de células da trofoectoderme, um procedimento bastante exigente tecnicamente.

A interação com a restante equipa de enfermagem e médica durante a realização de procedimentos como a punção folicular, a inseminação intrauterina ou a transferência embrionária permitiram um maior contacto com o papel que desempenham e compreensão do trabalho de equipa envolvido num tratamento de infertilidade.

Durante este ano foi possível auxiliar a equipa laboratorial na gestão de *stock* bem como na organização e planeamento de trabalho, material e meios. Foi ainda possível colaborar no registo de dados no laboratório e na atualização de bases de dados.

O balanço final é francamente positivo e toda a experiência reforçou a minha vontade de investir nesta vertente da minha formação de modo a adquirir experiência profissional numa área tão exigente e, no futuro, poder ter um papel ativo e relevante na realização do sonho de tantos casais.

Capítulo VII

Referências

Bibliográficas

- Abbara A, Vuong LN, Ho VNA, Clarke SA, Jeffers L, Comninou AN, Salim R, Ho TM, Kelsey TW, Trew GH, *et al.* Follicle size on day of trigger most likely to yield a mature oocyte. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**:193.
- Acharya KS, Acharya CR, Bishop K, Harris B, Raburn D, Muasher SJ. Freezing of all embryos in *in vitro* fertilization is beneficial in high responders, but not intermediate and low responders: an analysis of 82,935 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril* 2018;**110**:880–887.
- Acharya KS, Provost MP, Yeh JS, Acharya CR, Muasher SJ. Ectopic pregnancy rates in frozen versus fresh embryo transfer in *in vitro* fertilization: A systematic review and meta-analysis. *Middle East Fertil Soc J* 2014;**19**:233–238.
- Agha-Hosseini M, Hashemi L, Aleyasin A, Ghasemi M, Sarvi F, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M. Natural cycle versus artificial cycle in frozen-thawed embryo transfer: A randomized prospective trial. *Turkish J Obstet Gynecol* 2018;**15**:12–17.
- Alvarez S. Do some addictions interfere with fertility? *Fertil Steril* 2015;**103**:22–26.
- Amorosa JMH, Cleary-Goldman J, D'Alton ME. Physiologic effects of multiple pregnancy on mother and fetus. In Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, editors. *Fetal Neonatal Physiol* 2017;:, p. 167-176.e2. Elsevier: Philadelphia.
- Antsiferova YS, Sotnikova NY. Apoptosis and endometrial receptivity: Relationship with *in vitro* fertilization treatment outcome. *World J Obstet Gynecol* 2016;**5**:87–96.
- Aplin JD, Ruane PT. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 2017;**130**:15–22.
- ASEBIR. *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos*. 2015; Góbal, Agencia Creativa Digital: Madrid.
- ASRM. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril* 2006;**86**:S264–S267. Elsevier.
- ASRM. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 2015;**103**:e9–e17. Elsevier.
- Ausmees K, Korrovits P, Timberg G, Punab M, Mandar R. Decline of seminal parameters in middle-aged males is associated with lower urinary tract symptoms, prostate enlargement and bladder outlet obstruction. *Int Brazilian Soc Urol* 2013;**39**:727–740.
- Bassil R, Casper R, Samara N, Hsieh T-B, Barzilay E, Orvieto R, Haas J. Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? *J Assist Reprod Genet* 2015;**35**:1301–1305.
- Bernabò N, Ordinelli A, Agostino R Di, Mattioli M, Barboni B. Network Analyses of Sperm–Egg Recognition and Binding: Ready to Rethink Fertility Mechanisms? *Omi A J Integ Biol*

2014;**18**:740–753.

Bertolin AR. ERA® Endometrial Receptivity Analysis Operations Manual. 2017; Disponível em: <https://www.igenomix.ca/hubfs/UPLOADS/Manual ERA ENG WL Agosto.pdf?hsLang=en-ca>. Acedido em 22/08/2019.

Boeddeker SJ, Hess AP. The role of apoptosis in human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2015;**108**:114–122.

Borges EJ, Zanetti BF, Setti AS, Braga DP, Figueira R de CS, Iaconelli AJ. FSH dose to stimulate different patient' ages: when less is more. *JBRA Assist Reprod* 2017;**21**:336–342.

Bourne H, Archer J. Sperm preparation techniques. In Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. *Textb Assist Reprod Tech Vol 1 Lab Perspect* 2018;; p. 50–64. CRC Press: Boca Raton, USA.

Briceag I, Costache A, Purcarea VL, Cergan R, Dumitru M, Briceag I, Sajin M, Ispas AT. Current management of tubal infertility: from hysterosalpingography to ultrasonography and surgery. *J Med Life* 2015;**8**:157–159.

Broughton DE, Moley KH. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil Steril* 2017;**107**:840–847.

Cai Q, Wan F, Huang K, Zhang H. Does the number of oocytes retrieved influence pregnancy after fresh embryo transfer? *PLoS One* 2013;**8**:e56189.

Carlson BM. Fertilization. *Ref Modul Biomed Sci* [Internet] 2014; Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383054283?via%3Dihub. Acedido a 01/08/2019

Carré J, Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri R. Does air pollution play a role in infertility?: a systematic review. *Environ Heal* 2017;**16**:82.

Check JH, Choe JK, Nazari A, Fox F, Swenson K. Fresh embryo transfer is more effective than frozen for donor oocyte recipients but not for donors. *Hum Reprod* 2001;**16**:1403–1408.

Christianson MS, Zhao Y, Shoham G, Granot I, Safran A, Khafagy A, Leong M, Shoham Z. Embryo catheter loading and embryo culture techniques: results of a worldwide Web-based survey. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1029–1036. Netherlands.

Chuang T-H, Hsieh J-Y, Lee M-J, Lai H-H, Hsieh C-L, Wang H-L, Chang Y-J, Chen S-U. Concordance between different trophectoderm biopsy sites and the inner cell mass of chromosomal composition measured with a next-generation sequencing platform. *MHR Basic Sci Reprod Med* 2018;**24**:593–601.

Chun S, Seo JE, Rim YJ, Joo JH, Lee YC, Koo YH. Efficacy of hyaluronan-rich transfer medium on implantation and pregnancy rates in fresh and frozen-thawed blastocyst transfers in

- Korean women with previous implantation failure. *Obstet Gynecol Sci* 2016;**59**:201–207.
- Ciarmela P, Critchley H, Christman GM, Reis FM. Pathogenesis of Endometriosis and Uterine Fibroids. *Obstet Gynecol Int* 2013;**2013**..
- Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, Rienzi L. The impact of biopsy on human embryo developmental potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int* 2016;**2016**..
- Clarke JF, Rumste MME van, Farquhar CM, Johnson NP, Mol BWJ, Herbison P. Measuring outcomes in fertility trials: can we rely on clinical pregnancy rates? *Fertil Steril* 2010;**94**:1647–1651.
- Coates A, Kung A, Mounts E, Hesla J, Bankowski B, Barbieri E, Ata B, Cohen J, Munné S. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2017;**107**:723-730.e3.
- Cole LA. Degradation Products of hCG, Hyperglycosylated hCG, and Free β -Subunit. In Cole LA, Butler SBT-HCG, editors. *Hum Chorionic Gonadotropin* 2010;, p. 109–118. Elsevier: London.
- Cole LA. Implantation and pregnancy failure. In Cole LABT-B of L, editor. *Biol Life* 2016;, p. 157–161. Academic Press: Oxford.
- CooperSurgical. Vitrification - Documented efficiency. 2018; Disponível em: <https://origio.marketport.net/MarketingZone/MZDirect/Source/57207d13-4d7e-4287-b6f6-84cc6b98fc23>. Acedido a 29/07/2019.
- CooperSurgical. ERPeak Endometrial Receptivity Test. 2019; Disponível em: <https://origio.marketport.net/MarketingZone/MZDirect/Source/c10b2359-8b70-4813-9c18-c8b6a001714c>. Acedido a 28/08/2019.
- Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, Cutting R, Ong K, Sallam H, Li TC. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online* 2014;**28**:14–38.
- Cozzolino M, Vitagliano A, Giovanni MV Di, Laganà AS, Vitale SG, Blaganje M, Drusany Starič K, Borut K, Patrelli TS, Noventa M. Ultrasound-guided embryo transfer: summary of the evidence and new perspectives. A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2018;**36**:524–542.
- Craciunas L, Tsampras N. Bed rest following embryo transfer might negatively affect the outcome of IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Fertil* 2016;**19**:16–22.
- Cutting R. Embryo transfer techniques and improving embryo implantation rates. In Carroll M, editor. *Clin Reprod Sci* 2019;, p. 341–346. Wiley: New York.

- Depalo R, Falagario D, Masciandaro P, Nardelli C, Vacca MP, Capuano P, Specchia G, Battaglia M. Fertility preservation in males with cancer: 16-year monocentric experience of sperm banking and post-thaw reproductive outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2016;**8**:412–420.
- Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;**11**:41.
- Dieamant FC, Petersen CG, Mauri AL, Comar V, Mattila M, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Nicoletti A, Oliveira JBA, *et al.* Fresh embryos versus freeze-all embryos - transfer strategies: Nuances of a meta-analysis. *JBRA Assist Reprod* 2017;**21**:260–272.
- Ebner T. Analysis of fertilization. In Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. *Textb Assist Reprod Tech Vol 1 Lab Perspect* 2018;; p. 193–199. CRC Press: Boca Raton, USA.
- Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2012;**18**:536–554.
- Eisenberg ML, Meldrum D. Effects of age on fertility and sexual function. *Fertil Steril* 2017;**107**:301–304.
- El-Toukhy T, Bhattacharya S, Akande VA. Multiple pregnancies following assisted conception. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 2018;**125**:e12–e18.
- Elder K, Dale B. Oocyte retrieval and embryo culture. *In-Vitro Fertil* 2001;; p. 157–190. Cambridge University Press: New York, USA.
- ESHRE. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;**26**:1270–1283. England.
- ESHRE. Eight million IVF babies since the birth of the world's first in 1978. *Focus Reprod* [Internet] 2018; Disponível em: <https://www.focusonreproduction.eu/article/barcelona-eim-consortium/18FEAA53-DB28-4634-8ABC-47A3D538E9D2>. Acedido a 15/12/2018.
- Fanchin R, Righini C, Ziegler D de, Olivennes F, Ledee N, Frydman R. Effects of vaginal progesterone administration on uterine contractility at the time of embryo transfer. *Fertil Steril* 2001;**75**:1136–1140.
- Fancsovičs P, Lehner A, Murber A, Kaszas Z, Rigo J, Urbancsek J. Effect of hyaluronan-enriched embryo transfer medium on IVF outcome: a prospective randomized clinical trial. *Arch Gynecol Obstet* 2015;**291**:1173–1179.
- Fauser BCJM. Medical approaches to ovarian stimulation for infertility. In Strauss JF, Barbieri R, editors. *Yen Jaffe's Reprod Endocrinol* 2014;; p. 743–778. Elsevier.
- Ferraretti AP, Marca A La, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus

- on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;**26**:1616–1624.
- Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;**10**:32.
- Fu W, Yu M, Zhang X-J. Effect of hyaluronic acid–enriched transfer medium on frozen–thawed embryo transfer outcomes. *J Obstet Gynaecol Res* 2018;**44**:747–755.
- Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev* 2014;**35**:851–905.
- Ghanem ME, Ragab AE, Alboghdady LA, Helal AS, Bedairy MH, Bahlol IA, Abdelaziz A. Difficult embryo transfer (ET) components and cycle outcome. Which is more harmful? *Middle East Fertil Soc J* 2016;**21**:114–119.
- Goldberg JM, Gingold J, Llarena N. Anatomic abnormalities and recurrent implantation failure. In Franasiak JM, Scott Jr. RT, editors. *Recurr Implant Fail* 2018;, p. 153–173. Springer.
- Groenewoud ER, Cohlen BJ, Al-Oraiby A, Brinkhuis EA, Broekmans FJM, Bruin JP de, Dool G van den, Fleisher K, Friederich J, Goddijn M, *et al.* A randomized controlled, non-inferiority trial of modified natural versus artificial cycle for cryo-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2016;**31**:1483–1492.
- Groenewoud ER, Macklon NS, Cohlen BJ, Group A trial study. Cryo-thawed embryo transfer: natural versus artificial cycle. A non-inferiority trial. (ANTARCTICA trial). *BMC Womens Health* 2012;**12**:27.
- Grøndahl ML, Christiansen SL, Kesmodel US, Agerholm IE, Lemmen JG, Lundstrøm P, Bogstad J, Raaschou-Jensen M, Ladelund S. Effect of women’s age on embryo morphology, cleavage rate and competence - A multicenter cohort study. *PLoS One* 2017;**12**:e0172456.
- Guan Y, Fan H, Styer AK, Xiao Z, Li Z, Zhang J, Sun L, Wang X, Zhang Z. A modified natural cycle results in higher live birth rate in vitrified-thawed embryo transfer for women with regular menstruation. *Syst Biol Reprod Med* 2016;**62**:335–342.
- Harrity C, Vaughan DA, Walsh DJ. A review of luteal support protocols for single embryo transfers: fresh and frozen. In Sills ES, editor. *Screen Single Euploid Embryo* 2015;, p. 273–293. Springer: Cham.
- Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group - best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod* 2011;**26**:41–46.
- Hatirnaz S, Pektas MK. Day 3 embryo transfer versus day 5 blastocyst transfers: A prospective randomized controlled trial. *Turkish J Obstet Gynecol* 2017;**14**:82–88.

- Hauser R. The environment and male fertility: recent research on emerging chemicals and semen quality. *Semin Reprod Med* 2006;**24**:156–167.
- Healy MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, DeCherney AH, Levy MJ, Hill MJ. Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles? *Fertil Steril* 2016;**105**:93-99.e1.
- Huang LN, Tan J, Hitkari J, Dahan MH. Should IVF be used as first-line treatment or as a last resort? A debate presented at the 2013 Canadian Fertility and Andrology Society meeting. *Reprod Biomed Online* 2015;**30**:128–136.
- Huang Q-Y, Rong M-H, Lan A-H, Lin X-M, Lin X-G, He R-Q, Chen G, Li M-J. The impact of atosiban on pregnancy outcomes in women undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer: A meta-analysis. *PLoS One* 2017;**12**:e0175501.
- Hwang K, Smith JF, Coward RM. Evaluation of the azoospermic male: a committee opinion. *Fertil Steril* 2018;**109**:777–782.
- Jahromi BN, Parsanezhad ME, Shomali Z, Bakhshai P, Alborzi M, Moin Vaziri N, Anvar Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: A narrative review of its pathophysiology, risk factors, prevention, classification, and management. *Iran J Med Sci* 2018;**43**:248–260.
- James JL, Carter AM, Chamley LW. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta* 2012;**33**:327–334.
- Jameson JL, Groot LJ De, Kretser DM de, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC. Female Infertility: Evaluation and Management. *Endocrinol Adult Pediatr* 2016;; p. 2260-2274.e4. W.B. Saunders.
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 2017;**6**:12–18.
- Jennings LK, Krywko DM. Pelvic Inflammatory Disease. *Stat Pearls [Internet] Treasure Isl [Internet]* 2019; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499959/>. Acedido a 16/02/2019.
- Jing S, Li XF, Zhang S, Gong F, Lu G, Lin G. Increased pregnancy complications following frozen-thawed embryo transfer during an artificial cycle. *J Assist Reprod Genet* 2019;**36**:925–933.
- Kalmantis K, Loutradis D, Lymperopoulos E, Beretsos P, Bletsas R, Antsaklis A. Three Dimensional Power Doppler evaluation of human endometrium after administration of oxytocine receptor antagonist (OTRa) in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet* 2012;**285**:265–270.
- Kamel RM. Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil* 2013;**14**:96–109.

- Kang H-J. Programmed versus natural frozen embryo transfer: which is the best nest? *Fertil Steril* 2018;**110**:636–637.
- Kasius A, Smit JG, Torrance HL, Eijkemans MJC, Mol BW, Opmeer BC, Broekmans FJM. Endometrial thickness and pregnancy rates after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:530–541.
- Kava-Braverman A, Martínez F, Rodríguez I, Álvarez M, Barri PN, Coroleu B. What is a difficult transfer? Analysis of 7,714 embryo transfers: the impact of maneuvers during embryo transfers on pregnancy rate and a proposal of objective assessment. *Fertil Steril* 2017;**107**:657-663.e1.
- Keenan J, Marshall E, Heidel E. Women over 37 have superior pregnancy rates with frozen compared with fresh embryo transfers - an analysis of 43,5765 cycles from the national art surveillance system (NASS). *Fertil Steril* 2017;**108**:e167–e168.
- KITAZATO. Vitrificação e Meios de Aquecimento - as melhores taxas de sobrevivência. 2019; Disponível em: <https://www.kitazato-dibimed.com/pt-pt/vitrificacao-cryotop/vitrification-warming-media/>. Acedido a 29/07/2019.
- Konc J, Kanyo K, Kriston R, Somoskoi B, Cseh S. Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *Biomed Res Int* 2014;**2014**:307268.
- Kovac JR, Khanna A, Lipshultz LI. The effects of cigarette smoking on male fertility. *Postgrad Med* 2015;**127**:338–341.
- Kovacs P. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;**12**:124.
- Lathi RB, Chi Y-Y, Liu J, Saravanabavanandhan B, Hegde A, Baker VL. Frozen blastocyst embryo transfer using a supplemented natural cycle protocol has a similar live birth rate compared to a programmed cycle protocol. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:1057–1062.
- Lawrenz B, Fatemi HM. Effect of progesterone elevation in follicular phase of IVF-cycles on the endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online* 2017;**34**:422–428.
- Lawrenz B, Melado L, Fatemi H. Premature progesterone rise in ART-cycles. *Reprod Biol* 2018;**18**:1–4.
- Le Q V, Abhari S, Abuzeid OM, DeAnna J, Satti MA, Abozaid T, Khan I, Abuzeid MI. Modified natural cycle for embryo transfer using frozen-thawed blastocysts: A satisfactory option. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;**213**:58–63.
- Lee AM, Connell MT, Csokmay JM, Styer AK. Elective single embryo transfer- the power of one. *Contracept Reprod Med* 2016;**1**:11.
- Lee MS, Cardozo ER, Karmon AE, Wright DL, Toth TL. Impact of transfer time on pregnancy

- outcomes in frozen-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2018;**109**:467–472.
- Lee SH, Lee JH, Park Y-S, Yang KM, Lim CK. Comparison of clinical outcomes between *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in IVF-ICSI split insemination cycles. *Clin Exp Reprod Med* 2017;**44**:96–104.
- Lei nº 58/2017 “Procriação Medicamente Assistida” *Diário da República nº 142/2017, Série I* 2017-07-25 [Internet] 2017;3915–3922 Disponível em: <https://data.dre.pt/eli/lei/58/2017/07/25/p/dre/pt/html>. Acedido a 14/01/2018.
- Levin D, Hasson J, Cohen A, Or Y, Ata B, Barzilay L, Almog B. The effect of endometrial injury on implantation and clinical pregnancy rates. *Gynecol Endocrinol* 2017;**33**:779–782.
- Li X, Huang R, Fang C, Wang Y, Liang X. Live birth rate after fresh or frozen-thawed embryo transfers in relation to maternal age: a retrospective cohort study of 13426 cycles. *Fertil Steril* 2016;**106**:e142.
- Liebermann J. Human embryo vitrification. In Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *Cryopreserv Mamm Gametes Embryos Methods Protoc* 2017;; p. 141–159. Springer New York: New York.
- Liu L, Zhao L, Li TC, Zhu H, Lin X, Jin X, Tong X, Zhang S. Comparison of progesterone measurement on day of, and day after, hCG administration in IVF-embryo transfer cycles. *Reprod Biomed Online* 2015;**30**:157–165.
- Londra L, Moreau C, Strobino D, Garcia J, Zacur H, Zhao Y. Ectopic pregnancy after in-vitro fertilization: differences between fresh and frozen-thawed cycles. *Fertil Steril* 2015;**104**:110–118.
- Ma W, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:2963 LP – 2968.
- Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *J Hum Reprod Sci* 2015;**8**:121–129.
- Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage? *Reprod Biomed Online* 2016;**32**:142–146.
- Majumdar G, Majumdar A, Verma IC, Upadhyaya KC. Relationship between morphology, euploidy and implantation potential of cleavage and blastocyst stage embryos. *J Hum Reprod Sci* 2017;**10**:49–57.
- Mariani G, Bellver J. Embryo transfer. In Gardner DK, Simón C, editors. *Handb Vitro Fertil* 2017;; p. 331–342. Elsevier: Boca Raton, USA.
- Martins WP, Nastri CO, Rienzi L, Poel SZ van der, Gracia C, Racowsky C. Blastocyst vs cleavage-

- stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;**49**:583–591.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLOS Med* 2012;**9**:e1001356.
- Milewski R, Ajduk A. Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction* 2017;**154**:R37–R53.
- Miller D. Confrontation, consolidation, and recognition: The oocyte's perspective on the incoming sperm. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;**5**:a023408.
- Ming L, Yuan C, Ping Z, Ping L, Jie Q. Conventional *in vitro* fertilization maybe yields more available embryos than intracytoplasmic sperm injection for patients with no indications for ICSI. *Int J Clin Exp Med* 2015;**8**:21593–21598.
- Mishra V, Agarwal H, Goel S, Roy P, Choudhary S, Lamba S. A prospective case-control trial to evaluate and compare the efficacy and safety of Atosiban versus placebo in *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *J Hum Reprod Sci* 2018;**11**:155–160.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. First Week of Human Development. *Dev Hum* 2016a;, p. 27–29. Elsevier: Philadelphia, USA.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Second Week of Human Development. *Dev Hum* 2016b;, p. 39–42. Elsevier: Philadelphia, USA.
- Munch EM, Sparks AE, Zimmerman MB, Voorhis BJ Van, Duran EH. High FSH dosing is associated with reduced live birth rate in fresh but not subsequent frozen embryo transfers. *Hum Reprod* 2017;**32**:1402–1409.
- Munne S, Kaplan B, Frattarelli JL, Gysler M, Child TJ, Nakhuda G, Shamma FN, Silverberg K, Kalista T, Oliver K, *et al.* Global multicenter randomized controlled trial comparing single embryo transfer with embryo selected by preimplantation genetic screening using next-generation sequencing versus morphologic assessment. *Fertil Steril* 2017;**108**:e19.
- Murakami K, Kuroda K, Brosens JJ. Perturbation of endometrial decidualization. In Kuroda K, Brosens JJ, Quenby S, Takeda S, editors. *Treat Strateg Unexplained Infertil Recurr Miscarr* 2018;, p. 105–114. Springer: Singapore.
- Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, Zeng D, Fritz MA. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004;**81**:1333–1343.
- Nagy ZP. Assisted Fertilization. In Gardner DK, Simón C, editors. *Handb Vitro Fertil* 2017;, p. 153–167. CRC Press: Boca Raton, USA.

- Nakano FY, Leão R de BF, Esteves SC. Insights into the role of cervical mucus and vaginal pH in unexplained infertility. *MedicalExpress* 2015;**2**..
- Neri Q V., Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* 2014;**55**:24–37.
- Neri Q V., Pereira N, Cozzubbo T, Rosenwaks Z, Palermo GD. Intracytoplasmic sperm injection: Technical aspects. In Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. *Textb Assist Reprod Tech Vol 1 Lab Perspect* 2018;, p. 144–155. CRC Press: Boca Raton, USA.
- NICE. Fertility problems: assessment and treatment. *Natl Inst Heal Care Excel* [Internet] 2013; Disponível em: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156>. Acedido a 10/01/2018.
- NICE. Endometriosis: diagnosis and management. *Natl Inst Heal Care Excel* [Internet] 2017; Disponível em: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng73>. Acedido a 15/03/2019.
- Nouri K, Tempfer CB, Walch K, Promberger R, Dag S, Ott J. Predictive value of the time interval between embryo loading and transfer for IVF/ICSI success: a prospective cohort study. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;**13**:51.
- ObsEva. Nolasiban (OBE001) - Assisted Reproductive Technology. 2019; Disponível em: <https://www.obseva.com/nolasiban/>. Acedido a 04/09/2019.
- Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol* 2018;**17**:220–227.
- Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Mattila M, Dieamant F, Baruffi RLR, Franco Jr JG. Association between body mass index and sperm quality and sperm DNA integrity. A large population study. *Andrologia* 2018;**50**:e12889.
- Orvieto R. Triggering final follicular maturation-hCG, GnRH-agonist or both, when and to whom? *J Ovarian Res* 2015;**8**:60.
- Parmar M, Tomar S. Bicornuate uterus: Infertility treatment and pregnancy continuation without cerclage: An unusual case. *Open J Obstet Gynecol* 2014;**4**:981–985.
- Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Falcone T, Fossum G, Gitlin S, Gracia C, Hansen K, Barbera A La, et al. Performing the embryo transfer: a guideline. *Fertil Steril* 2017a;**107**:882–896.
- Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Falcone T, Fossum G, Gitlin S, Gracia C, Hansen K, Barbera A La, et al. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertil Steril* 2018;**109**:429–436.
- Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Fossum G, Falcone T, Gitlin S, Gracia C, Hansen K, Barbera A La, et al. Guidance on the limits to the number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertil Steril* 2017b;**107**:901–903.

- Pison G, Monden C, Smits J. Twinning rates in developed countries: trends and explanations. *Popul Dev Rev* 2015;**41**:629–649.
- Plowden TC, Hill MJ, Miles SM, Hoyt B, Yauger B, Segars JH, Csokmay JM, Chason RJ. Does the presence of blood in the catheter or the degree of difficulty of embryo transfer affect live birth? *Reprod Sci* 2017;**24**:726–730.
- Pribenszky C, Nilselid A-M, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;**35**:511–520.
- Puga-Torres T, Blum-Rojas X, Blum-Narvaez M. Blastocyst classification systems used in Latin America: is a consensus possible? *JBRA Assist Reprod* 2017;**21**:222–229.
- Quaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. *Rev Obstet Gynecol* 2008;**1**:69–76.
- Rajfer J. TESA or TESE: Which is better for sperm extraction? *Rev Urol* 2006;**8**:171.
- Rasool S, Shah D. Fertility with early reduction of ovarian reserve: the last straw that breaks the Camel's back. *Fertil Res Pract* 2017;**3**:15.
- Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:139–155.
- Rivera R, Garrido N. Metabolomics. In Enkel R, Samanta L, Agarwal A, editors. *Oxid Antioxidants Impact Oxidative Status Male Reprod* 2018;, p. 279. Academic Press.
- Robertshaw I, Bian F, Das SK. Mechanisms of uterine estrogen signaling during early pregnancy in mice: an update. *J Mol Endocrinol* 2016;**56**:R127–R138.
- Roque M, Haahr T, Geber S, Esteves SC, Humaidan P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update* 2018;**25**:2–14.
- Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CLR. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum Reprod Update* 2015;**21**:711–726.
- Santamaria X, Katzorke N, Simon C. Endometrial “scratching”: what the data show. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016;**28**:242–249.
- Santana DS, Cecatti JG, Surita FG, Silveira C, Costa ML, Souza JP, Mazhar SB, Jayaratne K, Qureshi Z, Sousa MH, *et al*. Twin pregnancy and severe maternal outcomes: The World Health Organization multicountry survey on maternal and newborn health. *Obstet Gynecol*

2016;**127**:631–641.

Sanverdi I, Ozkaya E, Kutlu T, Senol T, Akalin M, Sayar Akalin E, Sahin Y, Karateke A. Non-invasive prediction of implantation window in controlled hyperstimulation cycles: Can the time from the menstrual day at embryo transfer to expected menstrual cycle give a clue? *Turkish J Obstet Gynecol* 2016;**13**:116–122.

Saravelos SH, Wong AWY, Chan CPS, Kong GWS, Li T-C. How often does the embryo implant at the location to which it was transferred? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016;**48**:106–112.

Schoolcraft WB. Importance of embryo transfer technique in maximizing assisted reproductive outcomes. *Fertil Steril* 2016;**105**:855–860.

Sharif K, Serour GI. Dummy embryo transfer. In Kovacs G, Salamonsen L, editors. *How to Prep Endometrium to Maximize Implant Rates IVF Success* 2019;, p. 104–107. Cambridge University Press.

Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, Baker HWG. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod* 2008;**23**:1644–1653.

Shin JJ, Jeong Y, Nho E, Jee BC. Clinical outcomes of frozen embryo transfer cycles after freeze-all policy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Obs Gynecol Sci* 2018;**61**:497–504.

Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017;**51**:56–70.

Sigalos G, Triantafyllidou O, Vlahos N. How do laboratory embryo transfer techniques affect IVF outcomes? A review of current literature. *Hum Fertil* 2017;**20**:3–13.

Simón C. Diagnosis of endometrial receptivity using ERA. *3rd Biomark Meet Pers Reprod Med* [Internet] 2016; IGENOMIX: Valencia, Spain Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=wcLC2VNy7EA>. Acedido a 22/08/2019.

Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol* 2011a;**210**:5–14.

Singh N, Bahadur A, Mittal S, Malhotra N, Bhatt A. Predictive value of endometrial thickness, pattern and sub-endometrial blood flows on the day of hCG by 2D doppler in in-vitro fertilization cycles: A prospective clinical study from a tertiary care unit. *J Hum Reprod Sci* 2011b;**4**:29–33.

Singh N, Lata K, Malhotra N, Vanamail P. Correlation of site of embryo transfer with IVF Outcome: Analysis of 743 cycles from a single center. *J Hum Reprod Sci* 2017;**10**:102–107.

- Son W-Y, Tan SL. Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. *Expert Rev Med Devices* 2009;**6**:1–7.
- Stanhiser J, Hayward B, Ansari S, Mahony MC, Fritz MA, Mersereau JE. Fresh transfer compared to primary frozen embryo transfer (FET): retrospective analysis of demographics, cycle characteristics and implantation, pregnancy, and live birth rates. *Fertil Steril* 2017;**108**:e330–e331.
- Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:700–708.
- Stevenson EL, Hershberger PE, Bergh PA. Evidence-based care for couples with infertility. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2016;**45**:100–110.
- Stevenson EL, Sloane R. Certain less invasive infertility treatments associated with different levels of pregnancy-related anxiety in pregnancies conceived via *in vitro* fertilization. *J Reprod Infertil* 2017;**18**:190–196.
- Su-Mi K, Jong-Soo K. A review of mechanisms of implantation. *Dev Reprod* 2017;**21**:351–359.
- Sueldo CE, Borghi C, Nabel A. Trial embryo transfer (mock transfer). In Allahbadia GN, Chillik CF, editors. *Hum Embryo Transf* 2015;, p. 7–10. Springer, New Delhi: New Delhi.
- Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 2008;**14**:431–446.
- Tan TY, Lau SK, Loh SF, Tan HH. Female ageing and reproductive outcome in assisted reproduction cycles. *Singapore Med J* 2014;**55**:305–309.
- Tournaye H, Humberstone A, Lecomte V, Terrill P, Pierzynski P, Loumaye E. A placebo-controlled, randomized, double-blind study of pregnancy and live birth rates after single oral administration of a novel oxytocin antagonist, nolasiban, prior to embryo transfer. *Hum Reprod* 2017;**32**:12.
- Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. *Am J Obstet Gynecol* 2017;**216**:1–9.
- Vaughan DA, Leung A, Resetkova N, Ruthazer R, Penzias AS, Sakkas D, Alper MM. How many oocytes are optimal to achieve multiple live births with one stimulation cycle? The one-and-done approach. *Fertil Steril* 2017;**107**:397-404.e3.
- Visnova H, Tournaye HJ, Humberstone A, Terrill P, Macgregor L, Loumaye E. A placebo-controlled, randomized, double-blind, phase 3 study assessing ongoing pregnancy rates after single oral administration of a novel oxytocin receptor antagonist, nolasiban, prior to single embryo transfer. *Fertil Steril* 2018;**110**:e45.

- Vitagliano A, Spiezio Sardo A Di, Saccone G, Valenti G, Sapia F, Kamath MS, Blaganje M, Andrisani A, Ambrosini G. Endometrial scratch injury for women with one or more previous failed embryo transfers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2018;**110**:687-702.e2.
- Vladimirov IK, Tacheva D, Dobrinov V. The present and future of embryo cryopreservation. In Wu B, editor. *Embryol Theory Pract* [Internet] 2018; IntechOpen; Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/embryology-theory-and-practice>. Acedido a 17/09/2019.
- Voorhis B Van, Mejia RB. Single-embryo transfer point-it is the way forward. *Fertil Steril* 2017;**108**:757.
- Wang A, Santistevan A, Hunter Cohn K, Copperman A, Nulsen J, Miller BT, Widra E, Westphal LM, Yurttas Beim P. Freeze-only versus fresh embryo transfer in a multicenter matched cohort study: contribution of progesterone and maternal age to success rates. *Fertil Steril* 2017;**108**:254-261.e4.
- WHO. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010; Geneva : World Health Organization.
- Wong KM, Wely M van, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane database Syst Rev* 2017;**3**:CD011184.
- Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of placental development and its impact on fetal growth - new insights from mouse models. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**:570.
- Yan J, Wu K, Tang R, Ding L, Chen Z-J. Effect of maternal age on the outcomes of *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Sci China Life Sci* 2012;**55**:694–698.
- Yang W, Zhang T, Li Z, Ren X, Huang B, Zhu G, Jin L. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting clinical outcomes of frozen embryo transfer cycles with morphological good-quality blastocyst: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2018;**97**:e9577.
- Yanushpolsky EH. Luteal phase support in *in vitro* fertilization. *Semin Reprod Med* 2015;**33**:118–127.
- Yeung TWY, Chai J, Li RHW, Lee VCY, Ho PC, Ng EHY. The effect of endometrial injury on ongoing pregnancy rate in unselected subfertile women undergoing *in vitro* fertilization: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2014;**29**:2474–2481.
- Yuan X, Saravelos SH, Wang Q, Xu Y, Li T-C, Zhou C. Endometrial thickness as a predictor of pregnancy outcomes in 10787 fresh IVF-ICSI cycles. *Reprod Biomed Online* 2016;**33**:197–205.
- Zech J, Brandao A, Zech M, Lugger K, Neururer S, Ulmer H, Ruttman-Ulmer E. Elective frozen-

- thawed embryo transfer (FET) in women at risk for ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod Biol* 2018;**18**:46–52.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J de, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;**92**:1520–1524.
- Zhang J, Du M, Li Z, Wang L, Hu J, Zhao B, Feng Y, Chen X, Sun L. Fresh versus frozen embryo transfer for full-term singleton birth: a retrospective cohort study. *J Ovarian Res* 2018a;**11**:59.
- Zhang T, Li Z, Ren X, Huang B, Zhu G, Yang W, Jin L. Endometrial thickness as a predictor of the reproductive outcomes in fresh and frozen embryo transfer cycles: A retrospective cohort study of 1512 IVF cycles with morphologically good-quality blastocyst. *Medicine (Baltimore)* 2018b;**97**:e9689.
- Zhang Y, Sun J, Su Y, Guo Y, Sun Y. Ectopic pregnancy in frozen-thawed embryo transfer: A retrospective analysis of 4,034 cycles and related factors. *Syst Biol Reprod Med* 2013;**59**:34–37.
- Zhao X, Ma B, Mo S, Ma L, Chang F, Zhang L, Xu F, Wang L. Improvement of pregnancy outcome by extending embryo culture in IVF-ET during clinical application. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:321–329.
- Zhu H, Hou C-C, Luo L-F, Hu Y-J, Yang W-X. Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: Origins, transformation and functions. *Gene* 2014;**551**:1–14.

Capítulo VII

Anexos

- Anexo 1

Anexo 1 - Tabela 1. Tabulação cruzada entre a ocorrência de gravidez bioquímica após TEF e gravidez bioquímica após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar.

		Gravidez Bioquímica (TEC)	
		Com gravidez	Sem gravidez
Gravidez bioquímica (TEF)	Com gravidez	12	29
	Sem gravidez	53	85

Anexo 1 - Tabela 2. Tabulação cruzada entre gravidez clínica após TEF e gravidez clínica após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar.

		Gravidez clínica (TEC)	
		Com gravidez	Sem gravidez
Gravidez clínica (TEF)	Com gravidez	7	17
	Sem gravidez	43	112

Anexo 1 - Tabela 3. Tabulação cruzada entre gravidez ectópica após TEF e gravidez ectópica após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar.

		Gravidez ectópica (TEC)	
		Com gravidez	Sem gravidez
Gravidez ectópica (TEF)	Com gravidez	0	1
	Sem gravidez	4	174

Anexo 1 - Tabela 4. Tabulação cruzada entre parto após TEF e parto após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar.

		Parto (TEC)	
		Com parto	Sem parto
Parto (TEF)	Com parto	2	2
	Sem parto	12	115

Anexo 1 - Tabela 5. Tabulação cruzada entre abortamento após TEF e abortamento após TEC. Os valores destacados dizem respeito aos grupos discordantes, usados no cálculo do teste de McNemar.

		Abortamento (TEC)	
		Com abortamento	Sem abortamento
Abortamento (TEF)	Com abortamento	3	21
	Sem abortamento	18	137

- Anexo 2

Anexo 2 - Tabela 1. Descrição sumária da população total relativamente à técnica de inseminação e ao fator de infertilidade associado. Caracterização da amostra: número (n) e percentagem (%) do número de casos incluídos em cada classe definida. ♀ - Feminino; ♂ - Masculino.

Técnica de inseminação	Grupo A [23; 29]	Grupo B [30;34]	Grupo C [35;40]
FIV	6	43	20
ICSI	16	48	31
FIV/ICSI	1	2	2
ICSI - TESE	2	4	4
Total (N=179)	25	97	57

Fator de infertilidade	Grupo A [23; 29]	Grupo B [30;34]	Grupo C [35;40]
Ovulatório	6	10	6
Tubar	2	7	1
Endometriose	0	3	2
♀ e ♂	6	26	11
Masculino	9	37	25
Inexplicado	2	14	12
Total (N=179)	25	97	57

- Anexo 3

Anexo 3 - Tabela 1. Média da idade da mulher (com desvio-padrão) no momento da TEF para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco.

Ciclos com TEF	Média da idade feminina			
	Ocorrência de:	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
	Gravidez bioquímica	33,3 ± 3,73	33,1 ± 3,44	-0,357 0,721
	Gravidez clínica	33,9 ± 3,49	33,0 ± 3,50	-1,099 0,273
	Parto	31,4 ± 3,72	33,0 ± 3,47	1,004 0,317
	Abortamento	33,6 ± 3,66	33,1 ± 3,48	-0,650 0,511

Anexo 3 - Tabela 2. Média da idade da mulher (com desvio-padrão) no momento da TEC para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados.

Ciclos com TEC	Média da idade feminina			
	Ocorrência de:	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
	Gravidez bioquímica	34,1 ± 3,38	33,7 ± 3,75	-1,099 0,573
	Gravidez clínica	34,1 ± 3,30	33,8 ± 3,74	1,004 0,619
	Parto	33,6 ± 3,57	33,8 ± 3,63	0,200 0,835
	Abortamento	35,0 ± 3,31	33,7 ± 3,64	-1,501 0,135

- Anexo 4

Anexo 4 - Tabela 1. Média do número de oócitos recuperados na punção (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco. ** diferença estatisticamente marginalmente significativa.

Ciclos com TEF	Nº médio de oócitos recuperados na punção			
	Ocorrência de sucesso	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
Gravidez bioquímica		12,2 ± 4,22	14,0 ± 6,17	1,672 0,096**
Gravidez clínica		12,1 ± 4,83	13,8 ± 5,93	1,349 0,179
Parto		11,0 ± 6,25	13,7 ± 5,07	0,087 0,325
Abortamento		12,0 ± 4,30	13,8 ± 6,00	1,464 0,145

Anexo 4 - Tabela 2. Média do número de oócitos recuperados na punção (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados.

Ciclos com TEC	Nº médio de oócitos recuperados na punção			
	Ocorrência de sucesso	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
Gravidez bioquímica		14,4 ± 5,81	13,1 ± 5,79	-1,420 0,157
Gravidez clínica		13,9 ± 5,69	13,4 ± 5,87	-0,529 0,597
Parto		12,3 ± 5,99	13,4 ± 5,72	0,685 0,495
Abortamento		14,3 ± 6,12	13,5 ± 5,78	-0,640 0,523

- Anexo 5

Anexo 5 - Tabela 1. Média da taxa de fecundação (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco. * diferença estatisticamente significativa.

Ciclos com TEF	Média da taxa de fecundação			
	Ocorrência de sucesso	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
	Gravidez bioquímica	82,6 ± 13,78	77,1 ± 14,83	-2,112 0,036*
	Gravidez clínica	81,8 ± 15,14	77,8 ± 14,66	-1,231 0,220
	Parto	89,3 ± 10,44	79,5 ± 14,51	-1,495 0,137
	Abortamento	81,0 ± 14,55	77,9 ± 14,77	-0,941 0,348

Anexo 5 - Tabela 2. Média da taxa de fecundação (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados. * diferença estatisticamente significativa.

Ciclos com TEC	Média da taxa de fecundação			
	Ocorrência de sucesso	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
	Gravidez bioquímica	79,4 ± 15,10	77,7 ± 14,57	-0,709 0,479
	Gravidez clínica	78,8 ± 15,83	78,2 ± 14,36	-0,262 0,794
	Parto	89,1 ± 10,83	79,9 ± 13,77	-2,420 0,017*
	Abortamento	81,3 ± 13,16	78,0 ± 14,93	-0,972 0,332

- Anexo 6

Anexo 6 - Tabela 1. Média da espessura endometrial (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões a fresco.

Ciclos com TEF	Média da espessura endometrial			
	Ocorrência de:	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
	Gravidez bioquímica	9,2 ± 1,89	10,3 ± 2,11	2,754 0,202
	Gravidez clínica	9,0 ± 1,85	10,2 ± 2,10	2,533 0,335
	Parto	9,4 ± 1,18	10,0 ± 2,04	0,746 0,175
	Abortamento	9,3 ± 1,77	10,1 ± 2,13	1,785 0,229

Anexo 6 - Tabela 2. Média da espessura endometrial (com desvio-padrão) para os grupos em que se registou sucesso (Sim) ou insucesso (Não) para as medidas avaliadas (Gravidez bioquímica, Gravidez clínica, Parto e Abortamento) após transferência de embriões criopreservados.

Ciclos com TEC	Média da espessura endometrial			
	Ocorrência de:	Sim	Não	<i>t</i> <i>p</i>
	Gravidez bioquímica	10,3 ± 2,07	9,8 ± 2,10	-1,466 0,839
	Gravidez clínica	10,4 ± 2,09	9,9 ± 2,09	-1,306 0,763
	Parto	9,7 ± 1,92	9,9 ± 2,11	0,247 0,927
	Abortamento	10,4 ± 2,23	10,0 ± 2,08	-0,973 0,566

• Anexo 7

Anexo 7 - Tabela 1. Tabulação cruzada entre gravidez ectópica após TEC e o método de preparação endometrial (ciclo artificial ou natural).

			Ciclo		Total
			Artificial	Natural	
Gravidez ectópica (TEC)	Sem gravidez	<i>n</i>	70	105	175
		% em gravidez ectópica (TEC)	40,0%	60,0%	100,0%
		% em população total	39,1%	58,7%	97,8%
	Com gravidez	<i>n</i>	0	4	4
		% em gravidez ectópica (TEC)	0,0%	100,0%	100,0%
		% em população total	0,0%	2,2%	2,2%
Total	<i>n</i>		70	109	179
	% em gravidez ectópica (TEC)		39,1%	60,9%	100,0%
	% em população total		39,1%	60,9%	100,0%

Anexo 7 - Tabela 2. Tabulação cruzada entre gravidez bioquímica após TEC e o método de preparação endometrial (ciclo artificial ou natural).

			Ciclo		Total
			Artificial	Natural	
Gravidez bioquímica (TEC)	Sem gravidez	<i>n</i>	46	68	114
		% em Gravidez bioquímica (TEC)	40,4%	59,6%	100,0%
	Com gravidez	<i>n</i>	24	41	65
		% em Gravidez bioquímica (TEC)	36,9%	63,1%	100,0%
Total		<i>n</i>	70	109	179
		% em Gravidez bioquímica (TEC)	39,1%	60,9%	100,0%
Taxa Gravidez Bioquímica (%)			34,3	37,6	

Anexo 7 - Tabela 3. Tabulação cruzada entre gravidez clínica após TEC e o método de preparação endometrial (ciclo artificial ou natural).

			Ciclo		
			Artificial	Natural	Total
Gravidez clínica (TEC)	Sem	<i>n</i>	54	75	129
	gravidez	% em Gravidez clínica (TEC)	41,9%	58,1%	100,0%
	Com	<i>n</i>	16	34	50
	gravidez	% em Gravidez clínica (TEC)	32,0%	68,0%	100,0%
Total		<i>n</i>	70	109	179
		% em Gravidez clínica (TEC)	39,1%	60,9%	100,0%
Taxa Gravidez Clínica (%)			22,9	31,2	